



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

“EVALUACION HISTOLOGICA DE TEJIDO LINFOIDE DE LECHONES DE 15 DIAS DE EDAD, COLONIZADOS CON UN PROBIOTICO A BASE DE Streptococcus faecalis Y Lactobacillus casei”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

ALFREDO FRANCO GUTIERREZ

ASESOR: M.V.Z. M. EN C. ANDREA RODRIGUEZ ROPON.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO.

1999.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

274977

19
2es



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E.

ATN.: Q. M. DEL CARMEN GARCIA MIJARES
JEFE DEL DEPARTAMENTO.

Con base al articulo 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a Usted que revisamos el TRABAJO de tesis con el nombre de:

"Evaluación histológica de tejido linfoide de lechones de 15 días de edad, colonizados con un probiótico a base de Streptococcus faecalis y Lactobacillus casei".

que presenta el pasante: FRANCO GUTIERREZ ALFREDO
con número de cuenta : 9256679-8 para obtener el Título de :

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E.
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izc., México, a 8 de Febrero de 1999

Presidente DR. JORGE LUIS TORTORA PEREZ
Vocal MVZ. ANDREA RODRIGUEZ ROPON
Secretario MVZ. VICTOR QUINTERO RAMIREZ
1er. Sup. M.C. JOSE FRANCISCO MORALES ALVAREZ
2do. Sup. MVZ. SERGIO WALDO TELLO

DEDICATORIAS

A MI ESPOSA:

CYNTHIA, ERES UNA DE LAS PERSONAS MÁS IMPORTANTES A QUIEN DEDICO ESTE ESFUERZO, SIN TU CONFIANZA Y AYUDA RESULTARÍA MUY DIFÍCIL REALIZAR LO QUE HASTA AHORA HEMOS CONSEGUIDO. GRACIAS POR EXISTIR EN EL MISMO ESPACIO, MISMO MUNDO, MISMO TIEMPO. "COINCIDENCIAS TAN EXTRAÑAS DE LA VIDA". TE AMO Y TE VOY A AMAR SIEMPRE.

A MI HIJA:

SARAH ABIGAIL, POCAS VECES IMAGINÉ SER PAPÁ, OTRAS TANTAS SOÑÉ SER PAPÁ DE UNA NIÑA, PERO DEBES SABER QUE NUNCA, NUNCA ESPERÉ SER EL PAPÁ DE UNA NIÑA TAN PRECIOSA COMO LO ERES TÚ. LA CULMINACIÓN DE ESTE TRABAJO ES EL INICIO DE MI COMPROMISO PARA CONTIGO Y EL ORGULLO QUE REPRESENTAS PARA MÍ. NO TE VOY A DEFRAUDAR PORQUE TE QUIERO MUCHO.

A MIS PAPÁS:

ALFREDO FRANCO Y TERESA DE J. GUTIÉRREZ, A USTEDES DEBO EN GRAN MEDIDA LA FINALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO, SUS PALABRAS, REGAÑOS, MUESTRAS DE AFECTO Y AYUDA ME HAN LLEVADO A LO QUE EN ESTE MOMENTO SOY. AGRADEZCO QUE PUEDA CONTAR INCONDICIONALMENTE CON USTEDES, ESTO ES SOLAMENTE UNA PEQUEÑA MUESTRA DEL INFINITO AGRADECIMIENTO Y ORGULLO QUE POR USTEDES SIENTO. SEPAN QUE LOS QUIERO MUCHO.

A MIS HERMANOS:

GAUDETH, RICARDO[†], LUCY Y ENRIQUE, A USTEDES DEDICO ESTE LOGRO, PORQUE SON UNA PARTE IMPORTANTE DE MI VIDA, HEMOS COMPARTIDO MUCHAS ALEGRÍAS, JUEGOS, TRAVESURAS Y TRISTEZAS. QUE NUNCA TERMINE NUESTRA INFANCIA. A TI RICARDO, AUNQUE FUE POCO EL TIEMPO QUE ESTUVIMOS JUNTOS, CONTINUAS EN NUESTRA MENTE Y CORAZÓN. CON MUCHO CARIÑO DONDEQUIERA QUE TE ENCUENTRES.

A MIS ABUELOS:

MARÍA GUTIÉRREZ†, DAMIÁN FRANCO†, BENITA FLORES Y LINO GUTIÉRREZ†, POR INFUNDIR LOS VALORES Y PRINCIPIOS QUE AÚN PREVALECE. A MI ABUELO DAMIÁN, A PESAR DE NO HABERTE CONOCIDO, HASTA DONDE TE ENCUENTRES. A MI ABUELO LINO, POR QUE FUISTE DE LAS POCAS PERSONAS QUE CREYÓ EN MI, Y ME APOYASTE EN LA DECISIÓN DE ELEGIR ESTA HERMOSA PROFESIÓN, POR TODOS TUS CONSEJOS Y POR LOS MOMENTOS QUE COMPARTIMOS. A MI ABUELA MARÍA, POR DAR A MI NIÑEZ ILUSIÓN Y ALEGRÍA. A MI ABUELITA BENITA, POR TODA TU AYUDA Y APOYO, POR TU CARÍO. A TODOS USTEDES, ESPERANDO NO DEFRAUDARLES. CON TODO MI AMOR.

A MIS FAMILIARES:

A TODOS MIS TÍOS, A MIS PRIMOS Y SOBRINOS, POR SU APOYO, POR TODOS ESOS MOMENTOS JUNTOS, POR LOS RECUERDOS; ESTO TAMBIÉN ES PARTE DE USTEDES. GRACIAS FAMILIA FRANCO GUTIÉRREZ Y FAMILIA GUTIÉRREZ FLORES.

AGRADECIMIENTOS

AL SR. ISAAC Y A LA SRA. ALEJANDRINA:

POR TODOS SUS CONSEJOS Y LA AYUDA INCONDICIONAL QUE EN TODO MOMENTO ME OTORGARON, ASÍ COMO POR LA CONFIANZA DEPOSITADA, COMO MUESTRA DE MI GRATITUD.

A GABY Y JUAN:

A USTEDES, POR ESTAR EN LOS MOMENTOS MÁS DIFÍCILES, Y TAMBIÉN EN LOS MÁS FELICES, NUNCA TERMINARÉ DE AGRADECER LA GRAN FORTUNA DE CONTARLOS COMO PARTE DE MI FAMILIA.

A ISAAC:

PARTE DE LA REALIZACIÓN Y FINALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO FUE GRACIAS A TU APOYO Y MOTIVACIÓN. MUCHAS DE ESTAS LÍNEAS SE ENCUENTRAN AHORA AQUÍ GRACIAS A QUE CONTÉ CON LA UTILIZACIÓN DE TU COMPUTADORA. GRACIAS POR TUS ATENCIONES.

A MI ASESORA:

A ANDREA RODRÍGUEZ R., POR TODA SU PACIENCIA, CONOCIMIENTOS Y AYUDA EN EL DESARROLLO DE TODO ESTE TRABAJO. EL MÉRITO ES TUYO. CON MI AGRADECIMIENTO Y COMPLETA GRATITUD.

A MIS SINODALES:

AL DR. JORGE TÓRTORA, POR LA REVISIÓN Y VALIOSO APORTE EN LA FINALIZACIÓN DE ESTA TESIS Y EN MI FORMACIÓN COMO MÉDICO VETERINARIO. GRACIAS POR TODA SU AYUDA.

A VÍCTOR QUINTERO Y J. FRANCISCO MORALES, POR TODOS SUS CONSEJOS, ENSEÑANZAS, AYUDA Y AMISTAD BRINDADA LO LARGO DE MI ESTANCIA EN EL LABORATORIO DE PATOLOGÍA.

AL MVZ SERGIO WALDO, POR LA REVISIÓN DEL PRESENTE TRABAJO. MUCHAS GRACIAS.

AL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD ANIMAL:

AGRADEZCO ESPECIALMENTE A MIS COMPAÑEROS EN EL LABORATORIO DE PATOLOGÍA VETERINARIA, QUIENES CONTRIBUYERON EN GRAN MEDIDA CON MI FORMACIÓN PERSONAL Y PROFESIONAL. SINCERAS GRACIAS A JUAN C. DEL RÍO G., PATRICIA GARCÍA R., BLANCA R. MORENO C., DAVID A. GARCÍA G., JUAN S. BARRIENTOS P., LUIS E. GÓMEZ F., ALEJANDRO SÁNCHEZ P., BIBIANA CALDERÓN P., IGNACIO C. RANGEL R., ALEJO MARTÍNEZ L.

A MIS PROFESORES:

A TODOS LOS ACADÉMICOS, QUE CON EL TIEMPO DESTINADO A NUESTRA EDUCACIÓN, FORMAN PARTE ESENCIAL DE TODO EGRESADO. TODO MI AGRADECIMIENTO Y RESPETO POR TAN NOBLE DEDICACIÓN.

A MIS COMPAÑEROS DE GENERACIÓN:

A TODOS AQUELLOS AMIGOS PERTENECIENTES A LA GENERACIÓN '92, ESPECIALMENTE A FERNANDO I. SALAZAR H., HUGO ARELLANO M., EMILIO SÁNCHEZ D., ALEJANDRO BUENDÍA J., JORGE BUSTAMANTE S., GABRIEL GARDUÑO B., RENÉ PÉREZ DE LA R., JAVIER LÓPEZ V., IGNACIO ESCUDERO C., ISRAEL PAREDES I., GUSTAVO OSORIO V., ANA FLORES M., MARCELA B. AUDA R., ANGÉLICA BLANCO S., M^ª. DE LOURDES REYES P.

AGRADEZCO MUY ESPECIALMENTE A LOS MYZ JUAN C. DEL RÍO G., IGNACIO C. RANGEL R., BENITO LÓPEZ B. Y YOLANDA ROMERO, POR SU VALIOSA ASESORÍA Y APOYO EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO. MI MÁS SINCERO AGRADECIMIENTO.

A TI, QUE ME HAS ACOMPAÑADO EN TODO MOMENTO, QUE ME GUÍAS Y ACONSEJAS EN ESTOS INSTANTES; ES A TI AMIGO, A QUIEN DEBO LO QUE SOY. GRACIAS.

" DE TODO LO QUE EL MORFÓLOGO PUEDE ESTAR SEGURO ES DE LO QUE VE AL EXAMEN MACROSCÓPICO O EN UNA PREPARACIÓN HISTOLÓGICA. LA PREPARACIÓN HISTOLÓGICA REPRESENTA UN INSTANTE ÚNICO EN UNA LARGA SERIE DE EVENTOS; LO QUE OCURRIÓ EN LOS INTERVALOS ANTES Y DESPUÉS ES DESCONOCIDO Y DEBE SER LLENADO POR CONJETURAS, YA QUE INCLUSO LA DIRECCIÓN DEL MOVIMIENTO ES ALGUNAS VECES INCIERTA. LA MAYORÍA DE LOS PATÓLOGOS ESTARÁN DE ACUERDO EN LO QUE VEN, SIN EMBARGO, AL LLENAR LOS ESPACIOS DE LO QUE FALTA, NO SIEMPRE ESTÁN DE ACUERDO ".

THELMA B. DUNN.

ÍNDICE

	PÁGINA
Lista de esquemas, cuadros, gráficas y fotografías	I
Resumen.....	III
1. Introducción	1
1.1 Inmunidad intestinal	6
1.2 Órganos linfoides	14
1.3 Inmunomodulación y probióticos	20
2. Objetivos de la tesis	32
3. Hipótesis.....	33
4. Diseño experimental	33
5. Material y Metodología	35
5.1 Duodeno y Yeyuno	37
5.1.1 Linfocitos intraepiteliales	
5.1.2 Células plasmáticas	
5.1.3 Granulocitos eosinófilos	
5.2 Íleon	39
5.2.1 Micrometría	
5.2.2 Domos	
5.3 Linfonodos mesentéricos	41
5.3.1 Folículos linfoides	
5.3.2 Granulocitos eosinófilos	
5.3.3 Células plasmáticas	
5.4 Bazo	43
5.4.1 Vainas periarteriales	
5.4.2 Células plasmáticas	
5.4.3 Granulocitos eosinófilos	
6. Resultados	45
6.1 Duodeno	45

6.2 Yeyuno.....	51
6.3 Íleon	53
6.4 Linfonodo mesentérico posterior.....	56
6.5 Bazo	62
7. Discusión	69
8. Conclusiones	78
Apéndice	81
Literatura citada	90

LISTA DE ESQUEMAS, CUADROS, GRÁFICAS Y FOTOGRAFÍAS

	PÁGINA
Esquema 1. Longitud de los folículos linfoides cuando presentaron forma circular o elíptica.....	40
Cuadro 6.1. Resultados de las variables evaluadas en duodeno	47
Cuadro 6.2. Resultados de las variables evaluadas en yeyuno.....	52
Cuadro 6.3. Resultados de las variables evaluadas en íleon.....	55
Cuadro 6.4. Resultados de las variables evaluadas en linfonodo mesentérico posterior	58
Cuadro 6.5. Resultados de las variables evaluadas en parénquima esplénico	64
Cuadro 6.6. Resultados estadísticamente significativos obtenidos en el estudio histológico.....	68
Gráfica 1. Porcentaje de linfocitos intraepiteliales en duodeno	48
Gráfica 2. Cantidad de células positivas a la tinción VMP en lámina propia de duodeno	48
Gráfica 3. Cantidad de granulocitos eosinófilos en lámina propia de duodeno	49
Gráfica 4. Cantidad de células positivas a la tinción VMP en lámina propia de yeyuno	53
Gráfica 5. Cantidad de domos en la mucosa de íleon.....	56

Gráfica 6. Cantidad de folículos linfoides primarios en linfonodo mesentérico posterior	59
Gráfica 7. Área de folículos linfoides en linfonodo mesentérico posterior.....	60
Gráfica 8. Cantidad de células positivas a la tinción VMP en zona medular de linfonodo mesentérico posterior.....	60
Gráfica 9. Cantidad de focos de células plasmáticas en bazo.....	65
Gráfica 10. Cantidad de células plasmáticas en bazo.....	65
Gráfica 11. Cantidad de células positivas a la tinción VMP en bazo	66
Gráfica 12. Área de vainas periarteriales en bazo.....	66
Fotografía 1. Linfocitos intraepiteliales. Duodeno. Lechón tratado. Coloración HE. X320.	
	50
Fotografía 2. Folículos linfoides de placa de Peyer. Íleon. Lechón tratado. Coloración HE. X80.....	
	50
Fotografía 3. Célula pironinófila. Yeyuno. Lechón tratado. Coloración VMP. X800	
	61
Fotografía 4. Granulocitos eosinófilos. Yeyuno. Lechón tratado. Coloración Carbol cromótopo 2R. X800.	
	61
Fotografía 5. Folículos linfoides. Linfonodo mesentérico posterior. Lechón tratado. Coloración HE. X80.....	
	67
Fotografía 6. Vaina periarterial. Bazo. Lechón tratado. Coloración HE. X320.....	
	67

RESUMEN

“ EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE TEJIDO LINFOIDE DE LECHONES DE 15 DÍAS DE EDAD, COLONIZADOS CON UN PROBIÓTICO A BASE DE *Streptococcus faecalis* Y *Lactobacillus casei* ”

Alfredo Franco Gutiérrez

El uso de productos a base de bacterias lácticas ha mostrado mejorar los índices de productividad en explotaciones porcinas con disminución en la mortalidad y en la incidencia de diarreas, además de incrementar la ganancia de peso con mejores conversiones alimenticias. El presente trabajo esta enfocado a la determinación histológica de los cambios más significativos que un probiótico experimental induce sobre los tejidos linfoides de lechones de 15 días de edad. Para esto, se utilizaron 5 animales que formaron el grupo testigo y 5 para el grupo tratado, todos de diferentes camadas. Durante los tres primeros días de edad, a los animales del grupo tratado se les administró por vía oral un cultivo bacteriano a base de *Lactobacillus casei* y *Streptococcus faecalis*, y a los 15 días se sacrificaron y recolectaron segmentos intestinales de duodeno, yeyuno e íleon, linfonodos mesentéricos posteriores y bazo. Los cortes se tiñeron con la coloración de rutina de hematoxilina y eosina; con la coloración especial de verde metil pironina, para identificar células linfoides activadas, y la coloración especial para observar granulocitos eosinófilos, carbol cromótopo 2R. Para la evaluación se utilizó un microscopio óptico con el

que fueron evaluados los cortes histológicos, cuantitativamente y cualitativamente por una persona. Las variables evaluadas que mostraron diferencias estadísticas significativas entre los grupos experimentales fueron: en duodeno mayor cantidad de linfocitos intraepiteliales en los lechones tratados ($p < 0.001$), y mayor cantidad de células pironinófilas ($p < 0.05$) y de granulocitos eosinófilos en la lámina propia de los animales testigo ($p < 0.005$). En yeyuno mayor cantidad de células pironinófilas en la lámina propia de los animales tratados ($p < 0.005$). En íleon mayor cantidad de domos en la mucosa de los animales tratados ($p < 0.001$). En linfonodos mesentéricos mayor tamaño de los folículos linfoides pertenecientes a los animales tratados ($p < 0.0001$); mayor presencia de células pironinófilas en la zona medular de los linfonodos de los animales tratados ($p < 0.05$). En bazo mayor número de células plasmáticas en el parénquima de los animales tratados, observadas con la coloración de rutina ($p < 0.005$) y con la coloración especial de verde metil pironina ($p < 0.005$) y mayor área de las vainas periarteriales esplénicas en los mismos animales ($p < 0.0001$). El estudio histológico realizado, podría determinar la modificación del estado inmunológico en respuesta al probiótico evaluado, mejorando puntos específicos de importancia en el sistema inmune del lechón.

1. INTRODUCCIÓN

La prevención y el tratamiento de las enfermedades son de interés primario para productores, veterinarios y especialistas en producción animal, quienes pueden citar puntos económicos específicos que se relacionan directamente con la incidencia e intensidad de las enfermedades en la producción de animales de consumo. En realidad, hasta el consumidor de productos de origen animal es afectado por el costo en el uso de productos para la salud animal. ¹⁵

La tendencia moderna en los sistemas intensivos de producción de cerdos está orientada principalmente a optimizar los índices productivos. Es así como se ha intensificado la densidad animal, buscando razas altamente prolíficas que presenten aumento en las tasas de crecimiento, reducción de requerimientos nutricionales y mejoramiento de las canales hacia carne y disminución en grasa. Durante este período de rápido progreso, muchos productores han adoptado nuevos sistemas de manejo, en donde las unidades de producción han sido diseñadas para minimizar las labores y los costos de

producción, aumentando la densidad animal. Sin embargo, éstos índices de mayor eficiencia productiva han conducido a la presentación de problemas no deseables, como un incremento en condiciones de estrés y enfermedades, especialmente las infectocontagiosas. Los principales problemas son los que se presentan en el aparato digestivo, en el caso de los cerdos jóvenes (período de lactancia).²⁰

Al respecto, se han reportado un 42.0 % de morbilidad y un 10.8 % de mortalidad en cerdos lactantes.⁷⁷ Por otra parte, otros autores indican hasta un 73.0 % de morbilidad para dicho período.⁴² Otros estudios atribuyen a las infecciones intestinales entre un 8.0 y un 14.0 % de las muertes en el período de lactancia.²⁶ En algunos países, se reporta que en el período neonatal (desde el nacimiento hasta los 7 días), la mortalidad por cuadros entéricos puede alcanzar hasta un 23.73% del total registrado en maternidad.⁶⁷ Para este período, se puede considerar una mortalidad del 5 al 7% como la óptima, la cual es, en general, debida a lechones aplastados por la cerda y no por problemas que involucren agentes infecciosos.^{26,42,77} Consecuentemente, muchos esfuerzos y gastos se dirigen a

minimizar la incidencia de éstas enfermedades en los animales domésticos. Uno de los medios para reducirlas es incrementando la habilidad de los animales para resistir a estos problemas. ¹⁵

Se puede asegurar, que el manejo y la nutrición del lechón recién nacido y hasta los 30 kgs. de peso, representan un gran problema en la producción porcícola. Para poder optimizar el crecimiento y desarrollo del cerdo, se requiere comprender la fisiología, tanto digestiva como inmunológica del lechón. ¹⁹

Después de formarse en el ambiente estéril del útero, los lechones recién nacidos se encuentran en un ambiente rico en antígenos y son capaces de mostrar respuestas en el momento del nacimiento. No obstante, cualquier respuesta inmunitaria debe necesariamente ser una respuesta primaria, con un periodo de latencia prolongado y con concentraciones bajas de anticuerpos. Por esa razón, si no se les da "asistencia inmunológica", los animales mueren con rapidez frente a microorganismos que no son una gran amenaza vital para un adulto. Esta "asistencia inmunológica" es proporcionada en

forma de inmunidad pasiva, como transferencia de anticuerpos de la madre a su producto, en el calostro. Hay pruebas que indican que las células maternas linfoides también se transfieren al feto a través de la placenta, o al animal recién nacido por medio de calostro y la migración transintestinal. El calostro contiene hasta un millón de linfocitos por mililitro, la mitad de los cuales son del tipo T. Estos linfocitos sobreviven en el intestino del recién nacido hasta por 36 horas y algunos penetran en las paredes intestinales y llegan a los conductos y linfonodos mesentéricos. La vía por la cual los anticuerpos maternos llegan al feto depende del tipo de barrera placentaria. La placentación en los cerdos es epiteliocorial, y el epitelio coriónico fetal se encuentra en contacto con el epitelio uterino intacto. En este tipo de placentación, se evita por completo el pasaje trasplacentario de las moléculas de inmunoglobulina, y los recién nacidos dependen por completo de los anticuerpos que puedan recibir a través del calostro. ⁷⁶

En las primeras horas de vida es fundamental para el lechón la absorción de las inmunoglobulinas presentes en el calostro materno. Éste es rico en IgG (3,000 a 7,000 mg/dl) e

IgA (950 a 1,050 mg/dl), pero contiene también algunas cantidades de IgM (250 a 320 mg/dl). Estas inmunoglobulinas son de naturaleza proteica y fácilmente desnaturizadas a pH abajo de 4.5, por lo que durante ese período el estómago no secreta ácido clorhídrico. ^{1,4,41} Un estómago maduro genera un pH menor a 3.0, suficiente para poder degradar cualquier fuente proteica. Por otro lado, se debe de considerar que, en general, el crecimiento del lechón se produce bajo condiciones de: medios contaminados (sobre todo por bacterias enteropatógenas); numerosos manejos a los cuales los lechones están sujetos, como son la aplicación de hierro, corte de cola, destete, que producen situaciones de tensión favoreciendo el desarrollo de trastornos digestivos en los lechones; ingredientes poco compatibles con la fisiología del lechón, que son usados en la dieta y que no favorecen su maduración intestinal (harina de pescado, harina de soya, leches o sueros de mala calidad). ¹⁹

El sistema inmune del lechón es anatómica y fisiológicamente inmaduro, haciendo que su sobrevivencia dependa de la transferencia de anticuerpos maternos en el calostro y la leche. ⁷⁶ De esta manera, los lechones son

especialmente susceptibles a agentes infecciosos durante el período en el cual los niveles de anticuerpos han declinado en la leche y antes de que los mecanismos de inmunidad sean desarrollados. ⁴⁷

1.1 INMUNIDAD INTESTINAL

El epitelio intestinal provee una extensa superficie de absorción de los nutrientes digeridos, simultáneamente representa una barrera contra el gran número de antígenos que continuamente pasan a través del tracto digestivo. De acuerdo a lo anterior, el intestino ha desarrollado un sistema inmune complejo para controlar el ingreso de antígenos y eliminar a los patógenos. ^{46,48}

La mayoría de las invasiones en mucosas se resuelven por mecanismos inespecíficos de defensa, el sistema inmune mucosal representa la mayor parte del sistema de defensa inespecífico del organismo. Actualmente se acepta que el sistema inmune mucosal puede dividirse en dos compartimentos: sitios inductores, donde la respuesta inmune

se monta por primera vez y sitios efectores, donde los sistemas de defensa específicos ejercen su función y donde se mantiene la memoria inmunológica. Los sitios efectores comparten varias características: a) contienen células T principalmente CD4+; b) poseen bastantes células B y células plasmáticas, principalmente del isotipo IgA; y c) están cubiertos por células epiteliales que producen el componente secretor, que transporta la IgA dimérica a las secreciones externas. ³³

Anatómicamente, el sistema inmune intestinal es comúnmente dividido en compartimentos linfoides difusos y organizados o densos. El tejido linfático difuso comprende a las células linfoides (linfocitos y células plasmáticas) y macrófagos, localizados en el tejido conjuntivo formando agregados celulares; estas células se consideran parte de la población residente de la lámina propia del tracto intestinal; el tejido linfático organizado abarca las acumulaciones linfoides localizadas en la lámina propia de la mucosa, túnica submucosa y a veces en la adventicia. Estas acumulaciones suelen denominarse como "tonsilas". Las placas de Peyer de la pared intestinal son el ejemplo para este tracto. ⁶

El área bajo la monocapa epitelial, comúnmente referida como lámina propia, contiene bastantes macrófagos, linfocitos T, células conteniendo inmunoglobulinas (linfocitos B y células plasmáticas), eosinófilos y otros granulocitos. Tan pronto como nacen los lechones, los macrófagos incrementan su número y comienzan a acumularse en la cripta de la lámina propia, hasta que se alcanzan las cantidades máximas a las 5 semanas de edad.⁷⁵

Aunque linfocitos T y B están presentes en la lámina propia al nacimiento, el número celular se duplica durante las primeras cuatro semanas después del nacimiento.^{11,72} Paralelamente con el incremento numérico, los linfocitos T inmaduros se diferencian a CD4+ y CD8+ (marcador de superficie de linfocitos T cooperadores y citotóxicos respectivamente). Nominalmente, el número de linfocitos T CD4+ se incrementa durante la primer semana de edad, mientras que el número de linfocitos T CD8+ es bajo al nacimiento y se incrementa moderadamente entre las 5 y 7 semanas de edad.^{11,69} Sin embargo, en cerdos adultos los

linfocitos T CD8+ predominan en la lámina propia, como lo hacen en la sangre. ⁶⁹

Los linfocitos son también encontrados entre las células epiteliales o enterocitos. La mayoría de estos linfocitos intraepiteliales en humanos y roedores son linfocitos T, de los cuales casi todos son CD8+. En el cerdo, los linfocitos intraepiteliales aparecen durante el desarrollo, siendo la mayoría de ellos CD4-CD8-. Es hasta las 7 semanas de edad cuando una proporción significativa de linfocitos intraepiteliales son CD8+. ⁷⁵ Como la función de los linfocitos intraepiteliales no ha sido especificada, solo hay especulaciones y algunas evidencias de que éstas células contribuyen a la integridad del epitelio, destruyendo células dañadas o infectadas por alguna etiología viral. ⁴⁷ Se ha propuesto que estos linfocitos pueden tener funciones de "vigilancia" de las superficies epiteliales y formar parte de la primer línea de defensa, protegiendo a la mucosa del ambiente externo. ^{39,40}

Los linfocitos intraepiteliales se encuentran en el epitelio de las vellosidades intestinales con una densidad de hasta

3.3 \pm 0.6 linfocitos por 100 células epiteliales en lechones en los primeros 2 días de edad, hasta 38.9 \pm 3.5 linfocitos a los 30 días de edad. ²³

La barrera inmunológica mejor descrita en el intestino es la IgA secretoria, la cual es sintetizada por células plasmáticas que son expuestas primariamente a los antígenos, localizados en el tejido linfoide agregado en el intestino, (placas de Peyer). Las placas de Peyer son heterogéneas desde el punto de vista funcional. Algunas aumentan de tamaño desde el nacimiento hasta los seis meses de vida, y después experimentan regresión. Otras permanecen durante toda la vida adulta. Probablemente sea esta última población la que tiene el papel más importante en la defensa intestinal. En el cerdo existen dos tipos de placas de Peyer definidas por su localización diferencial, estructura y función; en el yeyuno y porción superior del íleon se encuentran varias placas discretas y en el íleon terminal una gran placa continua. ^{21,22,23} El tamaño de las placas está determinado por la edad y el contenido microbiano del intestino, pero el número y posición de las placas individuales permanece constante. ²¹ A pesar del tamaño de estas placas, la mayor parte de la IgA se

forma en el tejido linfoide difuso, en los plasmocitos aislados que se encuentran en las paredes del intestino. ^{56,59}

Entre los sitios inductores de inmunidad del tracto digestivo, el íleon está equipado con células especializadas en la captura de antígenos de la luz intestinal (células M). Estas células que pueden transportar antígenos a los sitios inductores de IgA y que también pueden actuar como células presentadoras de antígenos, se localizan en el epitelio modificado de la mucosa intestinal por sobre los centros germinativos de las placas de Peyer, esta región es conocida como "domo". Los linfocitos B precursores, después de reconocer al antígeno, se dividen y diferencian para dar lugar a la formación de células plasmáticas. No obstante, la mayor parte de estos linfocitos B con capacidad de respuesta, abandonan las paredes intestinales y emigran hacia los linfonodos, desde los cuales llegan al conducto torácico y a la circulación sanguínea. Estas células que recirculan, poseen afinidad por las superficies mucosas en general. En consecuencia, se alojan en intestino, vías respiratorias, vías urogenitales y glándulas mamarias. ⁷⁹

El desplazamiento de estos linfocitos B productores de IgA hacia las glándulas mamarias tiene la mayor importancia en la medicina veterinaria, ya que suministra una vía por la cual las células estimuladas por los microorganismos patógenos del intestino segregan su IgA en la leche, y así protegen al intestino de los animales recién nacidos. De esta manera, el intestino de los lechones recibe anticuerpos adecuados para cualquier microorganismo patógeno que encuentre. ⁷⁶

Uno de los medios que favorece el rápido reconocimiento de sustancias antigénicas y la distribución de la respuesta inmune es la migración de los linfocitos. ^{37,63} La extravasación linfocitaria es un proceso activo, el cual difiere en tiempo y extensión entre los diferentes tejidos. La constante recirculación linfocitaria y extravasación permite que contados linfocitos T o B reconozcan antígenos particulares y encuentren aquellos antígenos expuestos por las células presentadoras de antígenos en tejidos linfoides secundarios. Estos órganos linfoides secundarios incluyen al bazo, con la filtración del torrente sanguíneo, linfonodos filtrando la linfa aferente y los tejidos mucosales (tracto intestinal, respiratorio y urogenital), los cuales

identifican las sustancias antigénicas lumbales por diferentes mecanismos. ⁶³

Los tejidos linfoides y mucosales de cerdos sanos contienen un gran número de granulocitos eosinófilos. ^{43,71,80} Normalmente hay mucho más eosinófilos en los tejidos que en la circulación sanguínea y prevalecen en los sitios perivasculares, cerca de las mucosas. ⁴³ Su función en los tejidos linfoides es aún desconocida, mientras que en los tejidos mucosales probablemente constituyan una defensa contra microorganismos invasores. Las respuestas eosinofílicas son comunes, además de las parasitosis, en reacciones alérgicas y en inflamaciones crónicas, pero también pueden contribuir a las respuestas inmunes en ausencia de cualesquiera de estos procesos. ^{38,43} Los eosinófilos maduros pueden ser estimulados por variedad de fuentes, activarse y migrar a sitios específicos, donde sintetizan y secretan todas sus moléculas activas. Los eosinófilos activados tienen la capacidad de ingerir y matar microorganismos, aunque son fagocitos mucho menos eficientes que los macrófagos o neutrófilos. ⁴³

En los animales, es probable que el tracto digestivo sea el sitio de mayor estimulación antigénica. Las bacterias penetran con relativa facilidad la mucosa intestinal y de ésta manera consiguen acceso a los vasos linfáticos y portales. En consecuencia, éstos microorganismos son atrapados en los linfonodos mesentéricos y en el hígado respectivamente. Estos linfonodos son los que, por su localización, constantemente se ven estimulados por cualquier antígeno que ingresa por vía digestiva. ^{12,38}

1.2 ÓRGANOS LINFOIDES

Las células linfoides progenitoras migran a través de la sangre desde la médula ósea hasta el timo o el equivalente de la bolsa de Fabricio en aves. Cuando dichas células llegan a uno de estos órganos, el factor hormonal adecuado actúa sobre ellas; entonces se producen cambios en la célula progenitora, que la convertirán en un linfocito reconocible morfológicamente. Los órganos donde ocurre este proceso, y que además contienen linfocitos no funcionales, se denominan órganos linfoides primarios. En los mamíferos, éstos son el timo y la médula ósea.

Así, más del 90 % de las células del timo tienen las características morfológicas de los linfocitos y muchas de las propiedades de superficie de éstos, aunque son incapaces de desarrollar las funciones características de los linfocitos del timo. Esto significa que la gran mayoría de los linfocitos presentes en el órgano linfoide primario son células no funcionales. Los linfocitos abandonan los órganos linfoides primarios y se alojan en los órganos linfoides secundarios, donde se transforman en funcionales. Los órganos linfoides secundarios en mamíferos son bazo y linfonodos. Los órganos secundarios contienen una mezcla de linfocitos derivados del timo y de la bolsa, pero lo más importante es que los linfocitos del tejido linfoide secundario son capaces de realizar las funciones inmunes. ^{33,49}

Los linfonodos contienen gran cantidad de macrófagos y células dendríticas, que presentan los antígenos, poseen también linfocitos T y B, localizados en una red de tejido reticular, a través de la cual penetran los sinusoides linfáticos, en los cuales se transporta la linfa. Los folículos linfoides, se pueden encontrar inmunológicamente activos o competentes

(secundarios), constan de un centro germinal (que contiene diversas formas linfoides maduras e inmaduras y mitosis en gran número, dependiendo de la activación), y una corona externa (compuesta por formas linfoides maduras); y los folículos linfoides primarios, que no poseen el centro germinativo como los secundarios, debido a la ausencia de estimulación inmunológica. El linfonodo del porcino posee un patrón opuesto al que se observa en otras especies. Los folículos linfoides se localizan en las regiones central o medular del órgano, en tanto que los cordones medulares relacionados con ellos, se localizan en la región periférica o cortical. El flujo de la linfa corre al contrario de otras especies domésticas, esto significa que entra en el hilio y sale por la superficie capsular. Dada esta disposición, tal vez sea correcto referirse a los constituyentes primarios como folículos linfoides medulares y cordones corticales. Como en las otras especies, los linfocitos recirculantes entran a los linfonodos desde las vénulas postcapilares con la linfa aferente ^{6,55} y migran a los tejidos linfoides secundarios. ^{55,61,63} Sin embargo, en el cerdo, los linfocitos abandonan estos tejidos directamente con la sangre y

de ahí que la linfa eferente contenga muy pocos linfocitos en el cerdo. ¹⁴

Las funciones principales de los linfonodos son producir linfocitos, filtrar la linfa, eliminar partículas extrañas y producir anticuerpos. Los materiales antigénicos que llegan al linfonodo son fagocitados, procesados y presentados al sistema inmune por los macrófagos. La presentación origina la transformación blastoide de linfocitos B en células plasmáticas. ⁶

Así como los linfonodos sirven para filtrar los antígenos de la linfa, el bazo filtra la sangre. En el proceso se extraen tanto las partículas antigénicas como las células envejecidas. Además, el bazo almacena eritrocitos y plaquetas y, durante la vida fetal, participa en la eritropoyesis. El parénquima consta de dos regiones distintas dispuestas en un patrón al azar. Estas regiones se denominan pulpa blanca (en el cual se produce la respuesta inmunitaria) y pulpa roja (para almacenamiento de eritrocitos, captación de antígenos y hemocateresis). Los nódulos linfáticos (corpúsculos esplénicos) y las vainas periarteriales de linfocitos constituyen la pulpa blanca. Un

examen cuidadoso mostrará una arteriola, que ocupa una posición central o paracentral, algunas veces esta arteriola se denomina nodular. La presencia de los corpúsculos depende de los mismos factores que influyen en el desarrollo de los centros germinales en los linfonodos. La pulpa blanca consta de tejido linfático denso relacionado íntimamente con las ramas de las arterias trabeculares. El tejido linfático compacto forma las vainas periarteriales. Los corpúsculos esplénicos están distribuidos a lo largo de las arterias de la pulpa blanca y se intercalan con las vainas periarteriales; cada centro germinal de un corpúsculo esplénico está rodeado por una capa manto (zona manto) que se continúa con la vaina periarterial. Los límites periféricos de la pulpa blanca se separan de la pulpa roja por una zona marginal que consiste de senos, una vaina de células reticulares y una capa de células linfáticas. La vaina periarterial y la capa manto son regiones dependientes del timo, ocupadas por linfocitos T; el corpúsculo esplénico produce células B. El bazo no recibe vasos linfáticos aferentes de otras porciones del cuerpo. Los linfocitos se filtran a través del bazo, provenientes

de la sangre. Solo hay vasos linfáticos eferentes en la pulpa blanca. ^{6,79}

Al nacimiento, aunque todos los componentes celulares del sistema inmune están representados en el cerdo, ^{13,34,54} hay pocas células plasmáticas en el intestino, ³ pocos linfocitos intraepiteliales, ²³ pobre desarrollo de placas de Peyer ⁶⁴ y baja actividad de células NK, ¹³ pero en las primeras semanas de vida ocurren cambios cuantitativos importantes, ^{34,37,44,46,53,54} entre ellos hay un aumento en el número de neutrófilos, y aunque la proporción de linfocitos B no cambia, los números absolutos de linfocitos aumentan hasta el doble de los niveles de adulto. ⁵³ Los linfocitos T también se incrementan de manera considerable, sobre todo después de los 21 días. ³⁴

En forma natural, el lechón nace prácticamente estéril, libre de los microorganismos que normalmente colonizan el tracto. La colonización por microorganismos es inevitable, y el tipo de bacterias que la hará dependerá, básicamente, del medio ambiente donde se desarrolle el lechón. Por ello, es deseable que la flora que colonice inicialmente, esté constituida por

bacterias benéficas, tales como bacterias lácticas. ¹⁹ El beneficio más importante de la flora intestinal normal es el efecto protector de la salud del animal, llamado resistencia de colonización. ⁷⁸

1.3 INMUNOMODULACIÓN Y PROBIÓTICOS

En los últimos años, mucha investigación ha sido dirigida a conocer más a fondo y detalladamente los fenómenos fisiológicos que ocurren en el recién nacido, durante las primeras semanas de vida. Toda ésta investigación ha permitido orientar el cómo manejar y alimentar en forma más eficiente al lechón, buscando fundamentalmente, mejorar y acelerar el proceso de maduración fisiológica e inmunológica del tracto gastrointestinal, ya que el lechón es inmunológicamente inmaduro durante las primeras cuatro a siete semanas de vida. ¹⁹

La regulación de la respuesta inmune es extremadamente compleja. Sin embargo, se trata de entender cómo el sistema inmune, y todo el animal, organiza la respuesta corporal contra

un posible patógeno invasor. Con el conocimiento, de cómo responde el sistema inmune contra los organismos causantes de enfermedad, se pueden proponer caminos de intervención en la regulación de la inmunidad, particularmente por modulación de la respuesta inmune del hospedador. La inmunomodulación, como el término lo indica, puede ser usada para designar una supresión o un aumento de la respuesta inmune. Médicamente, la inmunosupresión inducida no es un interés práctico en la producción de los animales domésticos. Contrariamente, el aumento de la inmunidad ha recibido mucha atención en la alimentación animal y provee un medio para incrementar la resistencia del hospedero a las enfermedades. Otros sinónimos que frecuentemente se usan para los inmunomoduladores, incluyen inmunoestimuladores, inmunopotenciadores, agentes inmunoterapéuticos y modificadores de la respuesta biológica. ¹⁵

En los últimos años se ha dado una atención considerable al uso de probióticos, cultivos de levaduras y otros aditivos naturales en la producción del cerdo. Mucho de este interés ha sido generado por el incremento en el conocimiento público y

en la objeción al uso de antibióticos en aditivos del alimento, como promotores del crecimiento. El término probiótico fue utilizado por vez primera en 1974 para describir "organismos y sustancias que contribuyen a un balance microbiano intestinal". El origen de la palabra probiótico, viene de dos palabras griegas que significan "para la vida".⁵⁰

La creencia en los efectos benéficos de los probióticos, viene inicialmente, del argumento de Metchnikoff en 1907, en el sentido de que la longevidad de campesinos búlgaros, estaba relacionada con su consumo de grandes cantidades de leche fermentada con organismos tales como *Lactobacillus acidophilus*. Metchnikoff especulaba que microbios nocivos en el tracto intestinal excretaban sustancias que eran dañinas para el organismo. A través de la ingestión de organismos benéficos, los cuales creía que estaban contenidos en el yoghurt, se podía mejorar el ambiente intestinal mediante lo que hoy se llama "manipulación de la población microbiana". A través de la administración constante de organismos benéficos en la dieta, la colonización del tracto gastrointestinal por patógenos causantes

de enfermedad o bien organismos nocivos, era prevenida, y por consiguiente, se mejoraba la salud y las expectativas de vida.⁵⁰

La microbiología del tracto digestivo de los monogástricos ha sido ampliamente revisada.^{24,31,48,72} Se describe al ecosistema intestinal como una unidad abierta, integrada e interactiva, conteniendo muchos hábitats. Dentro de las primeras horas de vida, una pequeña población de microorganismos coloniza el tracto. La secuencia de eventos durante esta colonización no es igual para todas las especies. En la mayoría de los animales, los organismos que colonizan inicialmente son: cepas no patógenas de *E. coli*, *Streptococcus sp.*, *Clostridium sp.* y *Lactobacillus sp.* Posteriormente, como las bacterias facultativas eliminan el oxígeno, los anaerobios microaerofílicos llegan a ser los dominantes.^{7,73} Muchos tipos diferentes de bacterias anaerobias están presentes en el tracto digestivo normal de los animales monogástricos. De acuerdo a algunos estudios,³¹ las principales especies pueden ser clasificadas en tres diferentes grupos, la flora principal, la flora concomitante y la flora residual. El principal grupo, el cual representa más del 90 % del total, son la mayoría anaerobios obligados (bifidobacterias, lactobacilos y

bacteroides). El grupo concomitante o acompañante (menos de 1 % anaerobios facultativos) está compuesto principalmente por *Escherichia coli* y enterococos. El grupo residual (menos de 0.01 %) incluye organismos del género *Clostridium sp.*, *Proteus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, levaduras del género *Candida* y otras especies de bacterias patógenas y no patógenas. Sin embargo, la microflora normal de las diferentes especies animales, no es igual y cada parte del intestino tiene una colección única de microorganismos. ⁷²

Bajo condiciones ideales, la microflora intestinal es capaz de funcionar en un papel de apoyo para la protección de enfermedades y digestión de nutrientes. Trastornos en esta flora intrínseca, son creados por condiciones pobres de higiene en el lechón recién nacido; las tensiones (estrés) de sistemas de manejo intensivo, y en algún grado, el uso de antibióticos, el estado de tensión en un animal resulta comúnmente, en un incremento del pH intestinal, favoreciendo la proliferación de patógenos intestinales. En general, es el cerdo más joven el más susceptible a trastornos digestivos, y por lo tanto, el más prometedor a responder a los probióticos y la acidificación de la

dieta. ⁵⁰ Los efectos benéficos de los probióticos pueden ser mediados por un efecto antagónico directo en contra de grupos de organismos específicos, produciendo un decremento en número, o por algún efecto sobre su metabolismo, o por la estimulación de la inmunidad. ³⁰

MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS

1. Disminución de la cantidad de bacterias por:
 - a) Producción de compuestos antibacterianos.
 - b) Competencia por nutrientes.
 - c) Competencia por sitios de adhesión.
 - d) Modificación de las condiciones de pH y relación O_2 y CO_2 .
2. Alteración del metabolismo bacteriano.
 - a) Incremento en la actividad enzimática.
 - b) Decremento en la actividad enzimática.
3. Estimulación de la inmunidad.
 - a) Incremento de los niveles de anticuerpos.
 - b) Incremento en la actividad de macrófagos. ³⁰

La disminución de la cantidad de bacterias puede ser debida a la producción de sustancias antibacterianas. La elaboración de sustancias similares a los antibióticos, por *Lactobacillus sp.*, incluyen bacteriocinas bien caracterizadas (p. ej. nisina, reuterina, acidolina, bulgaricina, etc.), sustancias similares a bacteriocinas y otros antagonistas como el peróxido de hidrógeno y ciertos ácidos orgánicos. ⁴⁵ El espectro de inhibición varía; algunas bacteriocinas inhiben solamente bacterias Gram positivas, mientras que la acidolina inhibe algunas especies de Gram positivas y Gram negativas y la reuterina inhibe a todas las bacterias, levaduras y hongos. ^{35,36}

El pH bajo se considera como el mayor mecanismo por el cual las bacterias productoras de ácido láctico (principalmente *Lactobacillus sp.*, *Bifidobacterium sp.* y *Streptococcus sp.*) inhiben el crecimiento in vivo e in vitro de algunas bacterias facultativas y anaerobias. La presencia del calostro en el intestino delgado de los lechones neonatos origina un ambiente ácido en la luz del intestino, el cual inhibe la producción de enterotoxinas de las bacterias patógenas. ^{2,58}

La hipótesis de la competencia en la luz intestinal entre las bacterias residentes y las invasoras, se deriva de las observaciones en cultivos en donde éstas compiten por los nutrientes. Se ha postulado que una flora bacteriana protectora consiste en un grupo diverso de microorganismos capaces de usar todas las fuentes potenciales de carbono en un ambiente particular. Si un organismo exógeno intenta ingresar a un ambiente donde no hay recursos energéticos disponibles, será incapaz de colonizar. Sin embargo, no hay datos suficientes que aporten evidencias para tal competencia en el intestino.^{31,36}

Otro mecanismo para prevenir la colonización por patógenos es la competencia por los sitios de adhesión sobre la superficie epitelial del intestino.³⁶ Evidencias indirectas para tal competencia se derivan de estudios en donde se recolectaron lavados homogeneizados a partir del contenido intestinal de lechones tratados con *L. lactis*, y se demostró que había mayor cantidad de lactobacilos y poca cantidad de *E. coli*, que en los lechones con diarreas y/o en los lechones no tratados.⁵⁸ Esta clase de evidencias sugieren que es deseable usar cepas adherentes cuando se elaboran probióticos. Sin embargo, se

debe tener en cuenta que la adhesión es un fenómeno específico del huésped, ^{8,29} y que la adhesión varía entre cepas de la misma especie. ⁸ También puede ser influenciado por las condiciones de crecimiento y el medio usado. ¹⁷

La manera en la que los lactobacilos pueden influenciar el metabolismo microbiano, se demostró utilizando *L. acidophilus* en el hombre, en donde se suprimió la actividad de la β -glucuronidasa, nitroreductasa y azoreductasa. ³² Los probióticos también tienen influencia incrementando la actividad de enzimas útiles como la β -galactosidasa, en el tratamiento de la intolerancia a la lactosa. ³⁰

Los animales convencionales con una flora intestinal completa, tienen una mayor actividad fagocitaria y niveles de inmunoglobulinas, comparados con los animales libres de microorganismos. ⁹

Se ha demostrado que los lactobacilos incrementan la cantidad de anticuerpos cuando se administraron a ratones libres de microorganismos, estimulando también la actividad fagocitaria. ⁶⁵

Para que las bacterias produzcan esta clase de efectos sistémicos, es necesario que migren del intestino a la circulación. La translocación de las bacterias desde el intestino hasta los nodos linfáticos mesentéricos y a otros órganos corporales juega un papel importante en la presentación inmunológica de las bacterias intestinales a los tejidos linfoides asociados al tracto intestinal. Los lactobacilos pueden translocar ¹⁰ y pueden sobrevivir varios días en el bazo, hígado y pulmones. ¹⁶

Los resultados obtenidos con lactobacilos administrados parenteralmente son de relevancia para entender los efectos de los probióticos. Por ejemplo, *L. casei* y *L. plantarum* administrados parenteralmente, estimulan la actividad fagocítica. ⁷⁰ Sin embargo, estos hallazgos de efectos sistémicos sobre la inmunidad indican que los probióticos tienen el potencial, no solo de afectar el balance de la flora intestinal, sino de influir en la patogénesis de enfermedades que ocurren en tejidos más allá del tracto intestinal. ³⁰

La introducción de flora intestinal de animales adultos sanos en los animales jóvenes, los hace resistentes a infecciones, cuando posteriormente son desafiados con *Salmonella sp.*,⁶² *Vibrio cholerae*,⁷³ *Shigella sp.*,³⁶ *Clostridium difficile*,⁶⁸ *C. botulinum*,⁵⁷ *Lawsonia intracelularis*,²⁷ este proceso de inhibición es conocido como el "concepto Nurmi" o de "exclusión competitiva";^{51,66} "antagonismo bacteriano",²⁸ "interferencia bacteriana",²⁵ "efecto barrera"²⁴ y "resistencia por colonización",⁷⁸ son términos que describen el mismo concepto. Esto significa que, las diferentes especies de bacterias de la flora intestinal de animales sanos, compiten por los sitios de unión, aún libres, en la mucosa intestinal de los animales jóvenes, y excluyen a todas aquellas especies potencialmente patógenas.^{51,66}

La creciente cantidad de evidencias sugiere que ciertos microorganismos, tales como *Lactobacillus casei* y *Streptococcus faecalis*, pueden ayudar a mantener un perfil microbiano favorable en el intestino, ya sean como parte de una población natural o como un suplemento microbiano en la dieta. Como parte de la flora natural, pueden ejercer efectos benéficos

a través de la exclusión competitiva y la producción de ácido láctico.⁵²

Dadas las características digestivas de los cerdos, y la particular deficiencia en el sistema inmune de los neonatos, el uso de probióticos es especialmente útil en los lechones en producción intensiva; se podrían disminuir muchos de los problemas entéricos y bien puede ser tomado como modelo experimental comparativo con la especie humana. En el presente estudio se evaluarán histológicamente los efectos que un probiótico experimental origina sobre tejidos linfoides en lechones de 15 días de edad, con la finalidad de determinar cómo se modifica la inmunidad en esta especie animal.

2. OBJETIVOS DE LA TESIS

2.1 GENERALES:

Valorar los cambios histológicos que ocurren en los tejidos linfoides de lechones colonizados con *Lactobacillus casei* y *Streptococcus faecalis* (probiótico experimental).

2.2 PARTICULARES:

Evaluar histológicamente las muestras de órganos linfoides de los grupos de lechones tratado y testigo, a partir de la tinción de rutina HE (Hematoxilina-Eosina).

Determinar, en ambos grupos, la presencia y cantidad de linfocitos activados y de granulocitos eosinófilos en los tejidos linfoides, por medio de las tinciones de verde metil pironina y la de carbol cromótopo, específica para eosinófilos.

Double

3. HIPÓTESIS

La utilización de probióticos en lechones induce cambios positivos significativos detectables histológicamente en los tejidos linfoides del lechón.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL

El grupo experimental de este trabajo, se formó por 5 lechones que fueron elegidos al azar de 5 camadas que recibieron el probiótico, una toma diaria durante los tres primeros días de vida (el probiótico utilizado, fue una mezcla de *Lactobacillus casei* y *Streptococcus faecalis* (10^9 UFC/ml), en una proporción de 2:1, resuspendido en caldo de cultivo). Todos los lechones fueron calostrados y procedían de cerdas de primer parto. El grupo testigo, con el cual se comparan los resultados del grupo anterior, se formó con 5 lechones elegidos también al azar de 5 camadas que recibieron un placebo. A los 15 días se sacrificaron por electrocución; se realizó la necropsia y se tomaron las siguientes muestras para su estudio histológico: duodeno, yeyuno, íleon, linfonodo mesentérico posterior y bazo

(para todas las muestras, las porciones de tejido recolectadas, fueron siempre de la misma región anatómica), y se conservaron en paraformaldehído durante 24 horas, y posteriormente, en alcohol al 70 % hasta su procesamiento histológico, para obtener cortes a los que se les realizaron las tinciones de rutina de hematoxilina-eosina (HE); la tinción para identificar células plasmáticas de verde metil pironina y la tinción específica para granulocitos eosinófilos.

Para las evaluaciones histológicas de los tejidos linfoides, se aprovecharon las facilidades otorgadas por los laboratorios de Histopatología Veterinaria y Análisis Clínicos, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM, y del laboratorio de Inmunología Molecular de la Escuela de Ciencias Biológicas del IPN.

Para el análisis de los datos obtenidos de la evaluación de los tejidos, se utilizó el programa estadístico Execustat, versión 3.0. de cada variable evaluada se obtuvieron 10 repeticiones de conteos por tejido y tener 50 repeticiones por grupo. De los dos grupos de datos, uno conteniendo el de los lechones tratados, y

el otro con los datos de los lechones testigo, se obtuvo el promedio, desviación estándar y comparación de medias, con la cual se determinó la existencia de diferencia estadística.

5. MATERIAL Y METODOLOGÍA

De cada individuo se contó con muestras de porciones de órgano semejantes, en cuanto a localización, de: duodeno, yeyuno, íleon, linfonodo mesentérico posterior y bazo. Las muestras incluidas en parafina de los grupos de animales tratado y testigo se cortaron en un micrótomo, con un grosor de entre 4 y 5 micras. Los cortes utilizados se colocaron en un baño de flotación a 37°C con gelatina previamente disuelta, para que se extendieran y adhirieran al portaobjetos, con el cual se recogieron. Después, se dejaron secar durante 10 minutos sobre una parrilla a 37°C. Posteriormente, para teñir los cortes, se desparafinizaron e hidrataron, por lo que, se hicieron pasar en xilol y en cambios de alcohol, en concentración descendente. Se tiñeron con cada una de las tres tinciones histológicas, teniendo para cada órgano y coloración un corte histológico (apéndice).^{18,74}

Ya con las muestras de tejido linfoide e intestino teñidas, se procedió primeramente a revisarlas con la tinción de rutina, posteriormente con la tinción de VMP y al final con la tinción especial para granulocitos eosinófilos. Todas las observaciones y evaluaciones las realizó una persona, utilizando un microscopio óptico y en algunas de las variables un ocular con escala graduada y contador leucocitario convencional.

5.1 DUODENO y YEYUNO

5.1.1 LINFOCITOS INTRAEPITELIALES. De los aspectos considerados importantes para estos segmentos intestinales teñidos con HE, se revisó la cantidad de linfocitos intraepiteliales; este dato se expresa en porcentaje, ya que se contaron 100 células del epitelio intestinal, considerando enterocitos y linfocitos entre estos enterocitos. Para tal conteo se utilizó el objetivo seco fuerte (X320), y se seleccionaron 10 vellosidades aleatoriamente de diferentes áreas de la mucosa. Para facilitar la evaluación celular cuantitativa, se utilizó un contador leucocitario.

5.1.2 CÉLULAS PLASMÁTICAS. Otro de los aspectos importantes en esta porción de tejido con la misma tinción fue la presencia de células plasmáticas en la lámina propia. Se cuantificaron las células por campo, con un aumento X320, (objetivo seco fuerte), de 10 campos elegidos aleatoriamente en el tejido.

Con la tinción especial de VMP, se cuantificaron las células positivas en la lámina propia de éstas porciones intestinales, eligiendo 10 campos con el objetivo seco fuerte (X320) aleatoriamente. Como células positivas se consideraron aquellas de citoplasma homogéneo con coloración roja y núcleo azul verdoso.

5.1.3 GRANULOCITOS EOSINÓFILOS. De manera similar al conteo de células plasmáticas se evaluaron los granulocitos eosinófilos, para lo que se eligieron aleatoriamente 10 campos con el objetivo seco fuerte (X320) y se determinó la presencia numérica de éstas células en cada uno de ellos.

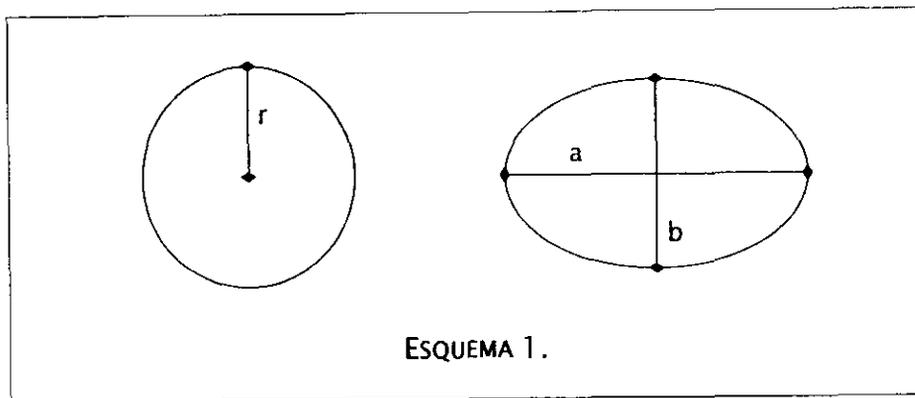
Con la tinción específica para granulocitos eosinófilos, se contaron las células positivas a esta tinción por campo con el objetivo seco fuerte (X320), de un total de 10 campos elegidos aleatoriamente. La reacción positiva de las células está determinada por la granulación rojiza del citoplasma y el núcleo segmentado o lobulado de tonalidad azul.

5.2 ÍLEON

En el íleon, además de evaluar lo mencionado para el caso de duodeno y yeyuno, se consideraron la cantidad y tamaño de los folículos linfoides de las placas de Peyer. En el caso de la cantidad, se cuantificaron los folículos que formaban a la placa de Peyer en su totalidad; en cuanto a su tamaño, se utilizó una lente con escala graduada, colocada en el ocular del microscopio, y con el objetivo seco débil (X80), se midió el diámetro de 10 folículos linfoides elegidos aleatoriamente, para posteriormente, determinar el área a milímetros cuadrados de estas estructuras para los 10 lechones.

5.2.1 MICROMETRÍA. Para la utilización de la lente graduada, con la ayuda de la cuadrícula de una cámara de Neubauer, se determinó la equivalencia de la unidad de la escala de ésta lente, donde un milímetro equivalía a 7.2 unidades de la lente (un milímetro = 7.2 unidades). La mayoría de los folículos linfoides presentaban una forma de corte circular, donde se utilizó la fórmula πr^2 ; algunos otros presentaban cortes elípticos, para este caso se aplicó la fórmula $\pi ab/4$, en donde,

para ambos casos, $\pi=3.1416$; r = radio de la estructura circular;
 a = eje mayor de la estructura elíptica, b = eje menor de la
elipse (esquema 1).



Esquema 1. Se presentan de manera gráfica las longitudes que se midieron para los folículos linfoides cuando presentaron forma circular y forma elíptica; r = radio; a = eje mayor; b = eje menor.

5.2.2 DOMOS. Se determinó el número de estas estructuras en la totalidad del corte histológico, para todas las muestras en los 10 lechones, utilizando el objetivo seco débil (X80).

5.3 LINFONODOS MESENTÉRICOS

5.3.1 FOLÍCULOS LINFOIDES. Para ambos tipos de folículos linfoides (primarios y secundarios), se evaluó la cantidad encontrada por campo observado con el objetivo seco débil (X80), de un total de 10 campos elegidos aleatoriamente para cada lechón. La forma de identificar ambos tipos de folículos, se basó en las características propias de cada uno. Para el caso de los folículos linfoides primarios, los cúmulos en forma redondeada de células linfocitarias (núcleos de cara cerrada) en la médula del órgano; para el caso de los folículos linfoides secundarios, la presencia de un cúmulo de células linfoblásticas (núcleos de cara abierta) al centro de los folículos linfoides (centro germinativo).

Asimismo, el tamaño que presentaron estos folículos linfoides en el corte histológico fue medido con la ayuda de la lente graduada, determinando el área en milímetros cuadrados, como fue descrito para el caso de los folículos linfoides de las placas de Peyer, tomando en cuenta 10 de estas estructuras para cada lechón.

5.3.2 GRANULOCITOS EOSINÓFILOS. Con la tinción de HE se hizo el conteo de células granulares eosinófilas en los senos linfáticos medulares y subcapsulares, que se localizaron entre los folículos linfoides, por campo observado con el objetivo seco fuerte (X320), tanto en corteza como en médula, de un total de diez campos por cada lechón. Posteriormente, se evaluó la cantidad de éstas células observadas con la coloración específica de carbol cromótopo 2R, con el mismo objetivo seco fuerte.

5.3.3 CÉLULAS PLASMÁTICAS. Utilizando la tinción especial, se cuantificó el número de células positivas para la tinción de VMP, tanto en corteza como en médula, por campo observado con el objetivo seco fuerte (X320), en 10 campos por muestra de cada lechón.

5.4 BAZO

5.4.1 VAINAS PERIARTERIALES. En los cortes histológicos de bazo, las estructuras inmunes que se evaluaron, fueron las vainas periarteriales, en particular la cantidad y el desarrollo. Para determinar la cantidad de vainas periarteriales en el corte histológico, se cuantificó el número de éstas por campo observado con el objetivo seco débil, de un total de 10 campos elegidos aleatoriamente para cada lechón.

Para la estimación del tamaño, fue necesario utilizar la lente graduada y calcular el área aproximada de estas estructuras en milímetros cuadrados. El método y fórmulas utilizadas fueron iguales a las explicadas en el cálculo de áreas de folículos linfoides de placas de Peyer.

5.4.2 CÉLULAS PLASMÁTICAS. Se encontraron cúmulos de células plasmáticas en la pulpa roja del bazo, por lo que se procedió a cuantificar el número de éstos focos. Se observaron con el objetivo seco débil (X80), eligiendo 10 campos aleatoriamente en todo el corte. Posteriormente, con el objetivo

seco fuerte (X320), de 10 focos, se determinó la cantidad de células plasmáticas que formaban esos cúmulos.

Con la tinción especial de VMP, se contaron las células positivas encontradas en 10 campos aleatoriamente con el objetivo seco fuerte (X320).

5.4.3 GRANULOCITOS EOSINÓFILOS. Para el caso de la tinción específica para granulocitos eosinófilos, de manera similar, en 10 campos aleatoriamente, con el objetivo seco fuerte (X320), se cuantificaron las células positivas a la tinción.

6. RESULTADOS

Cada grupo de datos fue analizado estadísticamente con el programa de cómputo Execusat versión 3.0, mediante el cual, por análisis de dos muestras y diferencia de medias, se determinó qué variables presentaban significancia. De cada variable, se agruparon las 50 repeticiones de cada conteo por campo para cada uno de los dos grupos que se trabajaron. Se derivó así, una serie de resultados para cada una de las estructuras descritas en la metodología, datos que se mencionan a continuación:

6.1 DUODENO

Las evaluaciones realizadas en el duodeno con la tinción de HE, indicaron una mayor cantidad porcentual de linfocitos intraepiteliales a favor del grupo tratado con el probiótico experimental (fotografía 1), diferencia que resultó significativa al comparar las medias de las dos muestras ($p < 0.001$) (gráfica 1).

La cantidad de células pironinófilas (fotografía 3) y de granulocitos eosinófilos observados con el objetivo seco fuerte

(X320) con la coloración HE en la lámina propia (fotografía 3), fue mayor en el grupo testigo, con un nivel de significancia de $p < 0.05$ y de $p < 0.005$, respectivamente (gráficas 2 y 3).

Para la cantidad de células plasmáticas cuantificadas con la tinción de HE, en la lámina propia, y de granulocitos eosinófilos observados con la tinción especial (fotografía 4), no hubo diferencia estadística entre los grupos.

Los resultados obtenidos para cada una de las variables evaluadas en este segmento, se muestran en el cuadro 6.1.

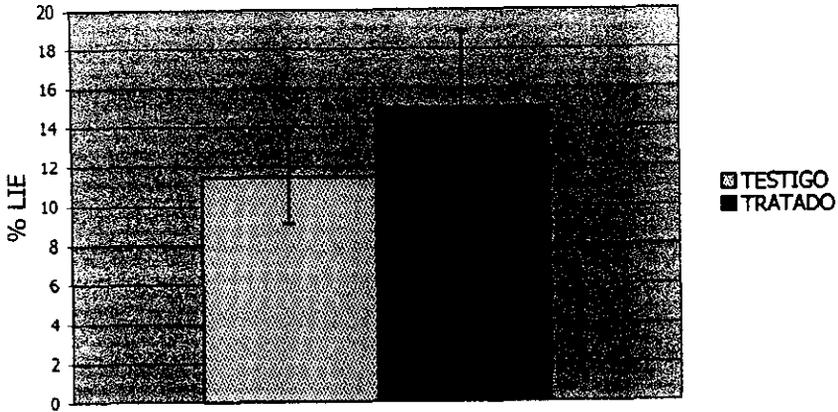
**CUADRO 6.1. RESULTADOS DE LAS VARIABLES EVALUADAS EN
DUODENO DE LOS 5 ANIMALES DE CADA GRUPO**

VARIABLE EVALUADA	GRUPO TESTIGO		GRUPO TRATADO	
	x	s	x	s
LIE	11.74 ^a	2.36	14.96 ^a	3.98
CP HE	1.84 ^a	1.23	1.45 ^a	1.11
Células activadas VMP	5.62 ^a	3.33	4.24 ^a	3.01
Eosinófilos HE	9.87 ^a	7.59	15.24 ^b	4.52
Eosinófilos CC2R	5.27 ^a	4.15	6.85 ^a	6.19

LIE: Linfocitos intraepiteliales; CP: Células plasmáticas; HE: Hematoxilina-Eosina; VMP: Verde Metil Pironina; CC2R: Carbol Cromótopo 2R; x: Promedio; s: Desviación estándar. Literales iguales entre los promedios (a,a) indica que no hay diferencia estadística significativa. Literales diferentes (a,b) indica hay diferencia entre los tratamientos.

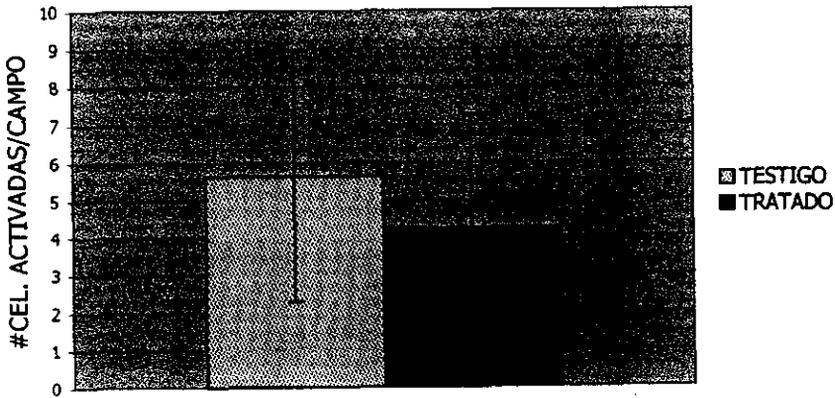
Cuadro 6.1. Se muestran los resultados obtenidos en las evaluaciones histológicas del duodeno de los cinco animales de cada grupo, observadas con las coloraciones HE, VMP y CC2R; los promedios y desviaciones estándar, se calcularon de los 50 datos obtenidos de cada una de las variables (10 datos para cada uno de los cinco lechones). La cantidad de LIE se expresa en %; el número de CP, células activadas y granulocitos eosinófilos son los cuantificados por campo observado con el objetivo seco fuerte (X320).

**CANTIDAD PROMEDIO DE LINFOCITOS INTRAEPITELIALES
EN DUODENO DE AMBOS GRUPOS DE ANIMALES**



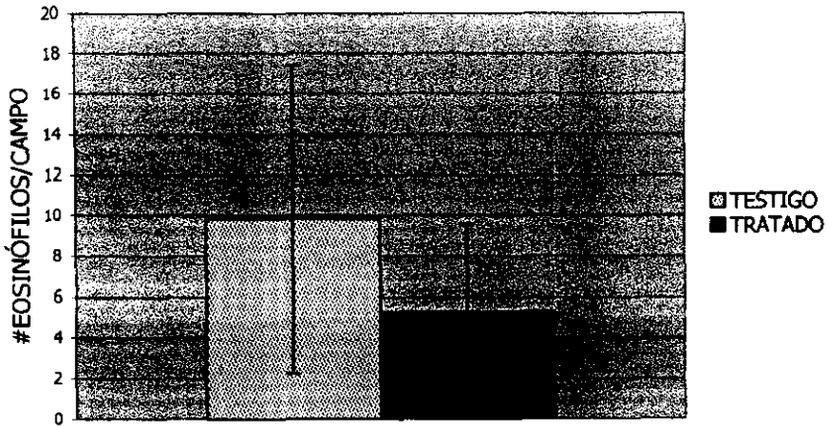
GRÁFICA 1. Esta gráfica muestra la cantidad porcentual de linfocitos intraepiteliales (LIE) en la mucosa de duodeno del grupo de lechones tratado y testigo. El eje de las ordenadas representa la cantidad porcentual de LIE; el eje de las abscisas muestra el promedio de los dos grupos de datos.

**CANTIDAD PROMEDIO DE CÉLULAS POSITIVAS A LA
TINCIÓN VMP EN LP DE DUODENO DE AMBOS GRUPOS DE
ANIMALES**

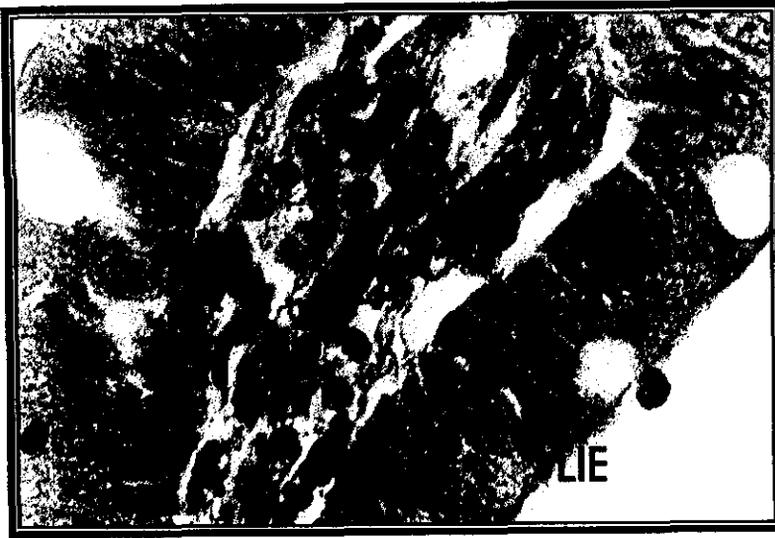


GRÁFICA 2. La gráfica muestra la cantidad de células activadas en la lámina propia del duodeno, en los lechones del grupo tratado y testigo, observadas con la tinción de Verde Metil Pironina (VMP). El eje de las abscisas presenta el promedio para los dos grupos de animales. El eje de las ordenadas muestra la cantidad de células activadas por campo observado con el objetivo seco fuerte (X320).

CANTIDAD PROMEDIO DE GRANULOCITOS EOSINÓFILOS EN LP DE DUODENO DE AMBOS GRUPOS DE ANIMALES



Gráfica 3. La gráfica muestra la cantidad de granulocitos eosinófilos en la lámina propia (LP) del duodeno, cuantificados con la tinción de HE. El eje de las abscisas presenta los promedios de los dos grupos de animales. El eje de las ordenadas muestra la cantidad de granulocitos eosinófilos por campo observado con el objetivo seco fuerte (X320).



Fotografía 1. Como una de las primeras líneas de defensa celular en la mucosa intestinal, los linfocitos intraepiteliales (LIE) fueron una de las variables a evaluar en este trabajo. Las muestras histológicas de los segmentos intestinales de duodeno, yeyuno e íleon del grupo de animales tratados con el probiótico experimental, presentaron mayor cantidad de LIE, mejorando esta primer línea de defensa de tipo celular. Duodeno. Lechón tratado. Coloración HE. X320.



Fotografía 2. El desarrollo de las placas de Peyer es más aparente en el grupo de lechones tratados con el probiótico experimental, debido al estímulo sobre los folículos linfoides (FL) de este tejido asociado a la mucosa de íleon; de igual manera, la cantidad de domos (D) en la mucosa fue mayor en los lechones del grupo tratado. Íleon. Lechón tratado. Tinción HE. X80.

6.2 YEYUNO

De las variables evaluadas en las muestras de yeyuno, solo la cantidad de células pironinófilas por campo observado con el objetivo seco fuerte (X320) (fotografía 3), presentó una diferencia significativa, a favor del grupo tratado ($p < 0.005$) (gráfica 4).

Para el grupo tratado, después de cuantificar las células en 10 campos observados aleatoriamente con el objetivo seco fuerte (X320), y promediar los 50 datos de los 5 animales de cada grupo, la cantidad porcentual de LIE y de células plasmáticas en lámina propia, observadas con la coloración HE, no presentaron diferencia significativa entre los grupos.

Los datos obtenidos para cada una de las variables evaluadas en este segmento se muestran en el cuadro 6.2.

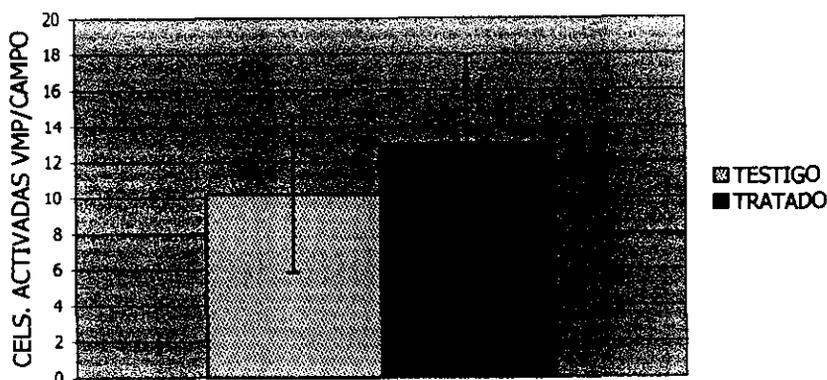
**CUADRO 6.2. RESULTADOS DE LAS VARIABLES EVALUADAS EN
YEUENO DE LOS 5 ANIMALES DE CADA GRUPO**

VARIABLE EVALUADA	GRUPO TESTIGO		GRUPO TRATADO	
	x	s	x	s
LIE	7.28 ^a	3.94	7.76 ^a	3.56
CP HE	1.28 ^a	1.01	1.52 ^a	0.86
Células activadas VMP	10.18 ^a	4.40	13.0 ^b	4.90
Eosinófilos HE	19.04 ^a	11.91	22.98 ^a	12.16
Eosinófilos CC2R	20.4 ^a	14.15	21.98 ^a	11.54

LIE: Linfocitos intraepiteliales; CP: Células plasmáticas; HE: Hematoxilina-Eosina; VMP: Verde Metil Pironina; CC2R: Carbol Cromótopo 2R; x: Promedio; s: Desviación estándar. Literales iguales entre los promedios (a,a) indica que no hay diferencia estadística significativa. Literales diferentes (a,b) indica hay diferencia entre los tratamientos.

Cuadro 6.2. Se muestran los resultados obtenidos de las evaluaciones histológicas del yeyuno de los cinco animales de cada grupo, observadas con las coloraciones HE, VMP y CC2R; los promedios y desviaciones estándar, se calcularon de los 50 datos obtenidos de cada una de las variables (10 datos para cada uno de los lechones). La cantidad de LIE se expresa en %; el número de CP, células activadas y granulocitos eosinófilos son los cuantificados por campo observado con el objetivo seco fuerte (X320).

**CANTIDAD PROMEDIO DE CÉLULAS POSITIVAS A LA
TINCIÓN VMP EN LP DE YEYUNO DE AMBOS GRUPOS DE
ANIMALES**



GRÁFICA 4. Esta gráfica muestra la cantidad de células pironinófilas en la lámina propia de yeyuno, observadas con la técnica especial de Verde Metil Pironina (VMP). El eje de las abscisas presenta los promedios para ambos grupos. El eje de las ordenadas muestra la cantidad de células activadas por campo observado con el objetivo seco fuerte (X320).

6.3 ÍLEON

La evaluación de la cantidad de domos en la mucosa de íleon observadas con la tinción de HE (fotografía 2), fue de las variables que presentó una diferencia estadística significativa a favor del grupo de lechones tratados. Mientras que en el grupo testigo se encontró en promedio 10.4 ± 2.08 domos, en el grupo tratado se encontraron 11.8 ± 2.06 domos en la mucosa de este órgano ($p < 0.001$) (gráfica 5).

La cantidad porcentual de LIE observada con la tinción de HE, no mostró diferencia significativa entre los dos grupos. De manera similar, la evaluación de la cantidad de células plasmáticas en la lámina propia, observada con HE, células pironinófilas, granulocitos eosinófilos observados con HE y con la tinción de carbol cromótopo 2R, mostraron diferencias que no resultaron estadísticamente significativas.

La cantidad de los folículos linfoides de las placas de Peyer en este segmento, no presentó diferencia estadística significativa. El área de las mismas estructuras, fue también otra de las variables, en la que el grupo tratado no mostró un incremento, comparado con aquellos del grupo testigo.

Los datos obtenidos para cada una de las variables evaluadas en este segmento se muestran en el cuadro 6.3.

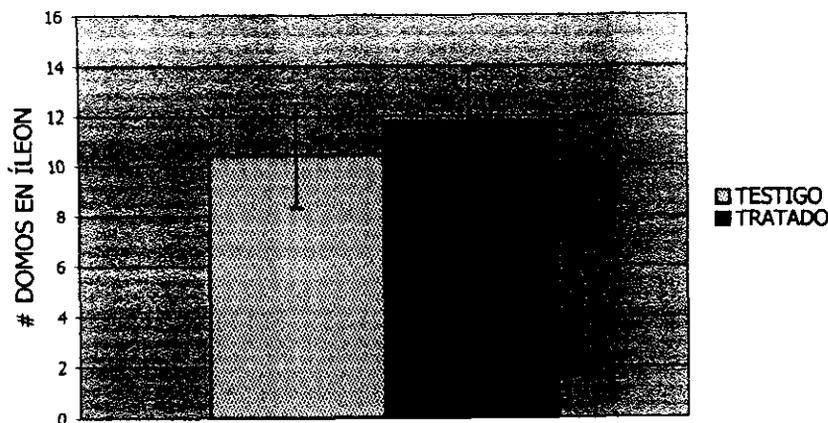
CUADRO 6.3. RESULTADOS DE LAS VARIABLES EVALUADAS EN ÍLEON DE LOS 5 ANIMALES DE CADA GRUPO

VARIABLE EVALUADA	GRUPO TESTIGO		GRUPO TRATADO	
	x	s	x	s
LIE	8.57 ^a	2.98	9.88 ^a	4.76
CP HE	0.72 ^a	0.83	0.80 ^a	0.97
Células activadas VMP	19.34 ^a	9.57	17.06 ^a	8.41
Eosinófilos HE	24.72 ^a	14.03	21.74 ^a	9.68
Eosinófilos CC2R	15.74 ^a	10.08	18.71 ^a	11.54
Domos en mucosa	10.4 ^a	2.08	11.81 ^a	2.06
FL PP	6.68 ^a	2.65	5.44 ^a	1.54
Área FL	0.1313 ^a	0.066	0.1607 ^a	0.0828

LIE: Linfocitos intraepiteliales; CP: Células plasmáticas; HE: Hematoxilina-Eosina; VMP: Verde Metil Pironina; CC2R: Carbol Cromótopro 2R; FL: Folículos linfoides; PP: Placa de Peyer; x: Promedio; s: Desviación estándar. Literales iguales entre los promedios (^{a,a}) indica que no hay diferencia estadística significativa. Literales diferentes (^{a,b}) indica que hay diferencia entre los tratamientos.

Cuadro 6.3. Se muestran los resultados obtenidos de las evaluaciones histológicas del íleon de los cinco animales de cada grupo, observadas con las coloraciones HE, VMP y CC2R; los promedios y desviaciones estándar, se calcularon de los 50 datos obtenidos de cada una de las variables (10 datos para cada uno de los lechones). La cantidad de LIE se expresa en %; el número de CP, células activadas y granulocitos eosinófilos son los cuantificados por campo observado con el objetivo seco fuerte (X320); la cantidad de domos y de FL de la PP son los cuantificados en la totalidad del corte, observados con el objetivo seco débil (X80); el área de los FL se expresa en mm².

CANTIDAD PROMEDIO DE DOMOS EN LA MUCOSA DE ÍLEON EN AMBOS GRUPOS DE ANIMALES



GRÁFICA 5. La gráfica presenta el número total de domos encontrados en la mucosa de íleon de los dos grupos que no hayos de lechones. El eje de las abscisas presenta los promedios de los dos grupos de animales. El eje de las ordenadas muestra la cantidad total de domos presentes en la mucosa de íleon.

6.4 LINFONODO MESENTÉRICO POSTERIOR

En la revisión de los cortes histológicos de linfonodos mesentéricos, la cantidad de folículos linfoides primarios (FLP) presentes en las muestras (fotografía 5), fue significativamente mayor en el grupo de lechones testigo ($p < 0.01$), en donde, en promedio, se cuantificaron 6.92 ± 3.06 FLP por campo observado con el objetivo seco débil (X80), de un total de 10 campos elegidos aleatoriamente para cada lechón, en tanto que

en el grupo tratado, en promedio se cuantificaron 4.86 ± 4.58 FLP (gráfica 6).

Por otra parte, la cantidad de folículos linfoides secundarios (FLS), no presentó una diferencia significativa entre los grupos. Sin embargo, al calcular el área tanto de FLP como de FLS, los linfonodos de los lechones del grupo tratado, presentaron folículos mucho más grandes ($p < 0.001$), con valores promedio de $7.13 \times 10^{-2} \pm 5.68 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$, comparados con aquellos del grupo testigo, $3.27 \times 10^{-2} \pm 2.437 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$ (gráfica 7).

La cantidad de células pironinófilas localizadas entre los folículos linfoides, mostró una diferencia significativa ($p < 0.01$) a favor del grupo de lechones tratado (gráfica 8); no así para la cantidad de células pironinófilas en la zona cortical, donde la diferencia no resultó significativa.

La cantidad de granulocitos eosinófilos evaluada con la tinción de HE, no mostró diferencia significativa entre los grupos; lo mismo al ser cuantificados con la tinción especial de carbol cromótopo 2R.

Los resultados de los análisis estadísticos de las variables evaluadas en este órgano se muestran en el cuadro 6.4.

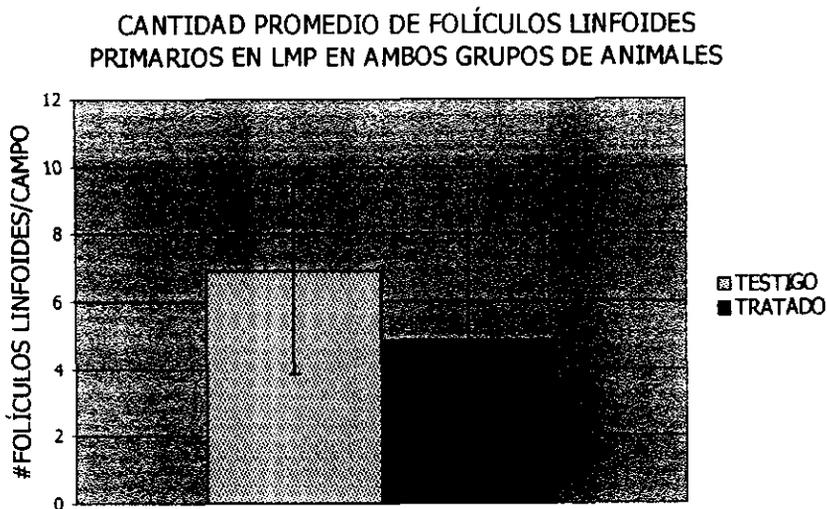
CUADRO 6.4. RESULTADOS DE LAS VARIABLES EVALUADAS EN LINFONODO MESENTÉRICO POSTERIOR DE LOS 5 ANIMALES DE CADA GRUPO

VARIABLE EVALUADA	GRUPO TESTIGO		GRUPO TRATADO	
	x	s	x	s
Foliculos linfoides-1os	6.02 ^a	3.06	3.86 ^b	4.58
Foliculos linfoides-2os	4.85	4.32	6.35 ^a	5.0
Area foliculos linfoides	0.0427 ^a	0.0251	0.0415	0.0668
Cels. activadas-ZC-VMP	4.52 ^a	4.28	4.34 ^a	3.77
Cels. activadas-ZM-VMP	4.37	5.05	4.72	3.95
Eosinófilos-HE	19.48	17.91	23.05 ^a	25.0
Eosinófilos-ZC-CC2R	7.12	8.08	8.53	9.63
Eosinófilos-ZM-CC2R	38.96	32.80	50.32 ^a	48.37

1os: Primarios; 2os: Secundarios; ZC: Zona Cortical; ZM: Zona Medular; HE: Hematoxilina - Eosina; VMP: Verde Metil Pironina; CC2R: Carbol Cromótopo 2R; x: Promedio; s: Desviación estándar. Literales iguales entre los promedios (a,a) indica que no hay diferencia estadística significativa. Literales diferentes (a,b) indica que hay diferencia entre los tratamientos.

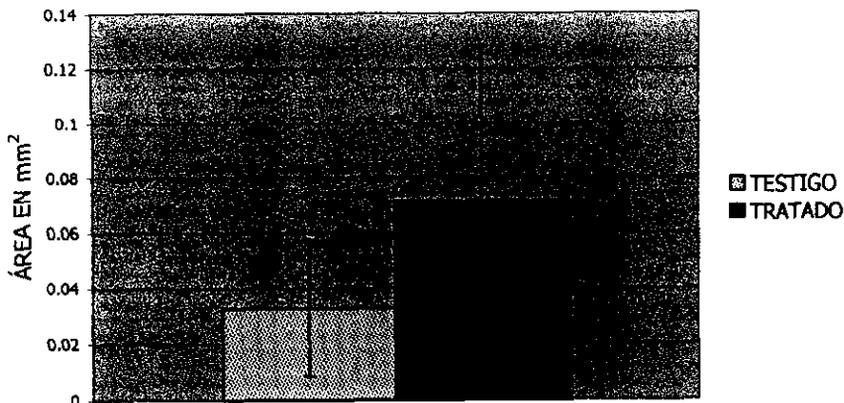
Cuadro 6.4. Se presentan los resultados obtenidos de las evaluaciones histológicas de los linfonodos mesentéricos de los cinco animales de cada grupo, observadas con las coloraciones HE, VMP y CC2R; los promedios y desviaciones estándar, se calcularon de los 50 datos obtenidos para cada una de las variables (10

datos para cada uno de los lechones). Para ambos tipos de folículos linfoides se evaluó la cantidad encontrada por campo observado con el objetivo seco débil (X80); el área de las mismas estructuras se expresa en mm² y la cantidad de células, tanto pironinófilas como granulocitos eosinófilos, representa las cuantificadas por campo observado con el objetivo seco fuerte (X320).



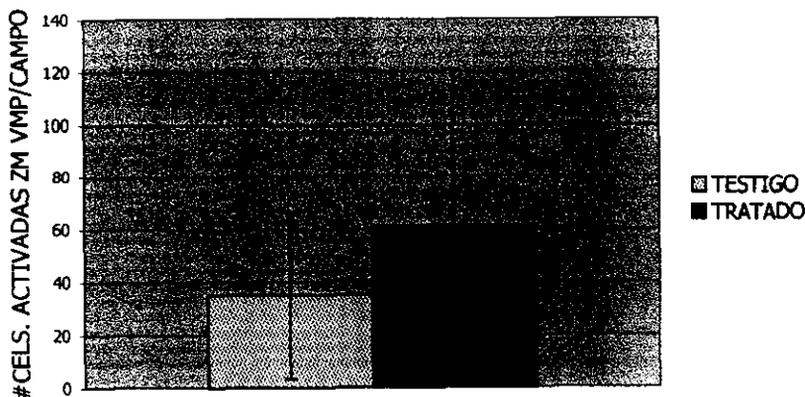
GRÁFICA 6. La gráfica presenta los resultados de la cantidad de folículos linfoides primarios en los linfonodos mesentéricos posteriores (LMP) de los dos grupos de animales. En el eje de las ordenadas se muestra el número de estas estructuras por campo observado con el objetivo seco débil (X80), y en el eje de las abscisas, los promedios de los dos grupos de animales.

ÁREA PROMEDIO DE FOLÍCULOS LINFOIDES EN LMP DE CADA GRUPO DE ANIMALES

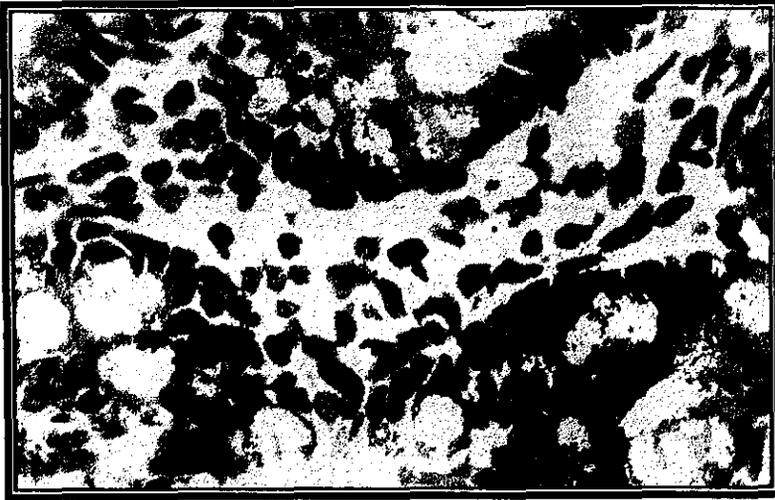


GRÁFICA 7. La gráfica presenta el área, determinada en milímetros cuadrados, de los folículos linfoides de los linfonodos mesentéricos posteriores (LMP). En el eje de las ordenadas se muestra el área de los folículos linfoides, y en el eje de las abscisas, los promedios de cada grupo.

CANTIDAD PROMEDIO DE CÉLULAS POSITIVAS A LA TINCIÓN VMP EN ZM DE LMP EN AMBOS GRUPOS DE ANIMALES



GRÁFICA 8. Se presentan los resultados de la cantidad de células positivas a la tinción de Verde Metil Pironina (VMP), en la zona medular (ZM) de los linfonodos mesentéricos posteriores (LMP). En el eje de las ordenadas se muestra la cantidad de estas células, mientras que en el eje de las abscisas, los promedios de cada grupo.



Fotografía 3. La técnica especial de Verde Metil Pironina, tiñe aquellos linfocitos activados (células plasmáticas), células que sintetizan las inmunoglobulinas. Las células pironinófilas presentan un citoplasma de color rojo, y un núcleo ovoide excéntrico de color verde-azul. La mucina, presente en el citoplasma de los exocricocitos calciformes presenta también reacción positiva a la coloración. Lámina propia yeyuno. Lechón tratado. X800.



Fotografía 4. La coloración especial para granulocitos eosinófilos (carbol cromótopo 2R), permite observar la localización de estas células en los cortes histológicos. Al centro de la imagen se observan 4 células con la característica forma lobulada de su núcleo y los gránulos rojos citoplasmáticos. Submucosa de yeyuno. Lechón tratado. X800.

6.5 BAZO

Las variables evaluadas en el bazo, son las que presentan más diferencias significativas; para el caso de la cantidad de focos de células plasmáticas observados con la tinción de HE, fue mayor en los bazos de los lechones tratados con el probiótico experimental ($p < 0.05$), en promedio 8.52 ± 5.39 focos de células plasmáticas por campo observado con el objetivo seco débil (X80), y en el grupo testigo 5.8 ± 6.61 focos de células plasmáticas (gráfica 9).

De manera similar, para el caso de la cantidad de células plasmáticas por foco, observadas con el objetivo seco fuerte (X320), el grupo tratado presentó mayor cantidad de células que el grupo testigo ($p < 0.005$) (gráfica 10).

Al observar la cantidad de células pironinófilas en el parénquima esplénico, el grupo tratado presentó mayor celularidad, en promedio 5.6 ± 3.25 células por campo observado con el objetivo seco fuerte (X320), mientras el grupo testigo un promedio de 3.8 ± 2.36 células ($p < 0.005$) (gráfica 11).

A pesar de que la cantidad de vainas periarteriales en el parénquima del bazo (ver imagen 6), no fue una variable con diferencia significativa, el área de estas estructuras fue mayor en los lechones del grupo tratado ($p < 0.0001$) (gráfica 12).

La cantidad de granulocitos eosinófilos cuantificada con la tinción especial, no mostró diferencia significativa entre los grupos.

Los resultados de las variables evaluadas en el parénquima esplénico se muestran en el cuadro 6.5.

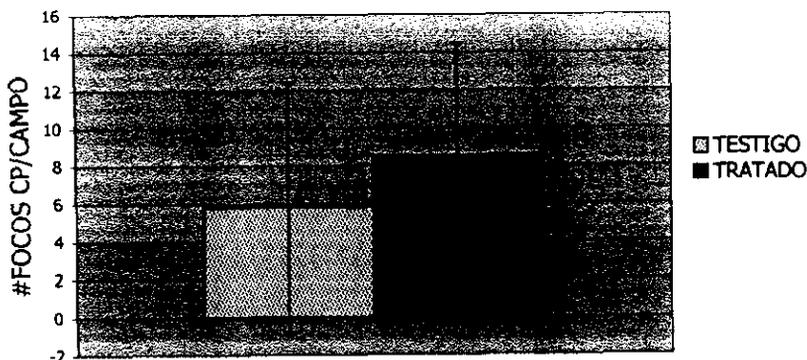
CUADRO 6.5. RESULTADOS DE LAS VARIABLES EVALUADAS EN PARÉNQUIMA ESPLÉNICO DE LOS 5 ANIMALES DE CADA GRUPO

VARIABLE EVALUADA	GRUPO TESTIGO		GRUPO TRATADO	
	x	s	x	s
Focos CP HE	5.8 ^a	6.61	8.52 ^b	5.93
CP HE	23.72	33.71	44.58 ^b	37.16
Cel. Activadas VMP	3.8 ^a	2.36	3.8 ^a	3.25
VP	2.38 ^a	1.85	2.38 ^a	1.85
Área VP	0.0113 ^a	7.06x10 ⁻⁴	0.0113 ^a	0.0113 ^a
Eosinófilos CC2R	2.6 ^a	2.10	2.6 ^a	2.10

CP: Células plasmáticas; HE: Hematoxilina-Eosina; VMP: Verde Metil Pironina; VP: Vaina periarterial; CC2R: Carbol Cromótopo 2R; x: Promedio; s: Desviación estándar. Literales iguales entre los promedios (a,a) indica que no hay diferencia estadística significativa. Literales diferentes (a,b) indica que hay diferencia entre los tratamientos.

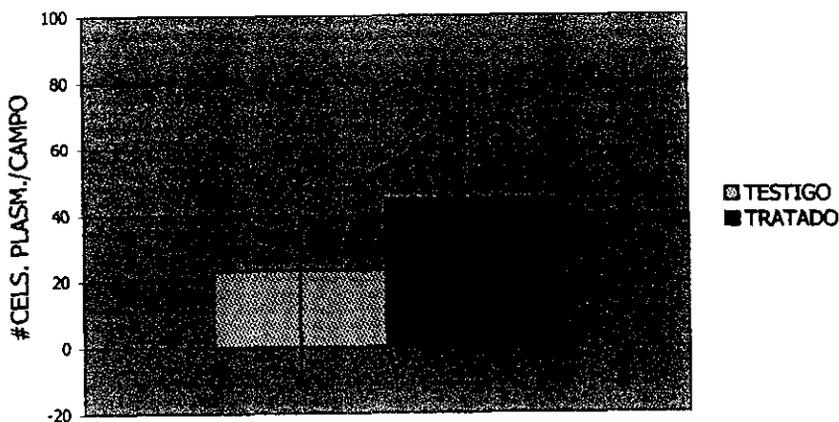
Cuadro 6.5. Se presentan los resultados obtenidos de las evaluaciones histológicas de los bazo de los cinco animales de cada grupo, observadas con las coloraciones HE, VMP y CC2R; los promedios y desviaciones estándar, se calcularon de los 50 datos obtenidos para cada una de las variables (10 datos para cada uno de los lechones). La cantidad de focos de CP y VP son los cuantificados por campo observado con el objetivo seco débil (X80); la cantidad tanto de CP, células activadas y granulocitos eosinófilos son las observadas por campo con el objetivo seco fuerte (X320); el área de las VP se expresa en mm².

**CANTIDAD PROMEDIO DE FOCOS DE CÉLULAS
PLASMÁTICAS EN BAZO EN AMBOS GRUPOS DE ANIMALES**



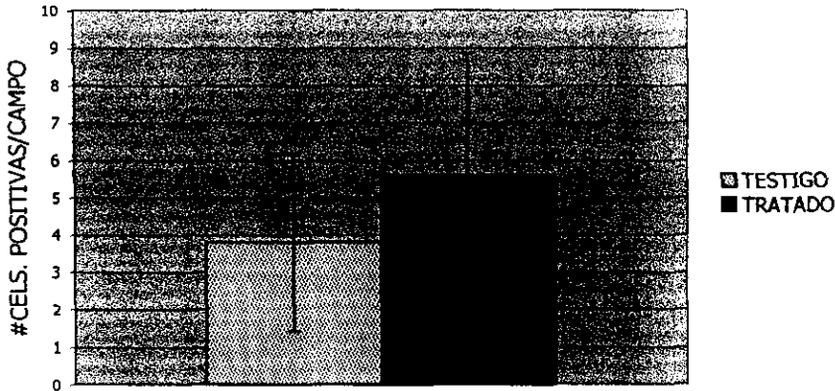
GRÁFICA 9. La gráfica presenta los resultados de la evaluación de la cantidad de focos de células plasmáticas por campo observado con el objetivo seco débil (X80) en el parénquima esplénico. En el eje de las ordenadas se muestra la cantidad de focos de células plasmáticas (CP), y en el eje de las abscisas, los promedios de los dos grupos.

**CANTIDAD PROMEDIO DE CÉLULAS PLASMÁTICAS EN BAZO
DE AMBOS GRUPOS DE ANIMALES**



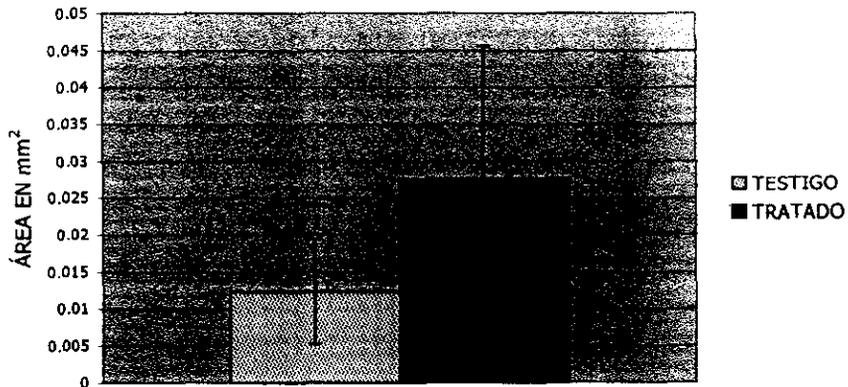
GRÁFICA 10. La gráfica representa la cantidad de células plasmáticas por campo observado con el objetivo seco fuerte (X320) en el parénquima esplénico, comparada entre ambos grupos. En el eje de las ordenadas se muestra la cantidad de estas células, y en el eje de las abscisas, los promedios de los dos grupos.

CANTIDAD PROMEDIO DE CÉLULAS POSITIVAS A LA TINCIÓN VMP EN BAZO EN AMBOS GRUPOS DE ANIMALES



GRÁFICA 11. La gráfica muestra los resultados comparativos de los dos grupos de animales en la evaluación de la cantidad de células positivas a la tinción de Verde Metil Pironina (VMP) por campo observado con el objetivo seco fuerte (X320) en el parénquima esplénico. En el eje de las ordenadas se muestra la cantidad de estas células, y en el eje de las abscisas, los promedios de los dos grupos.

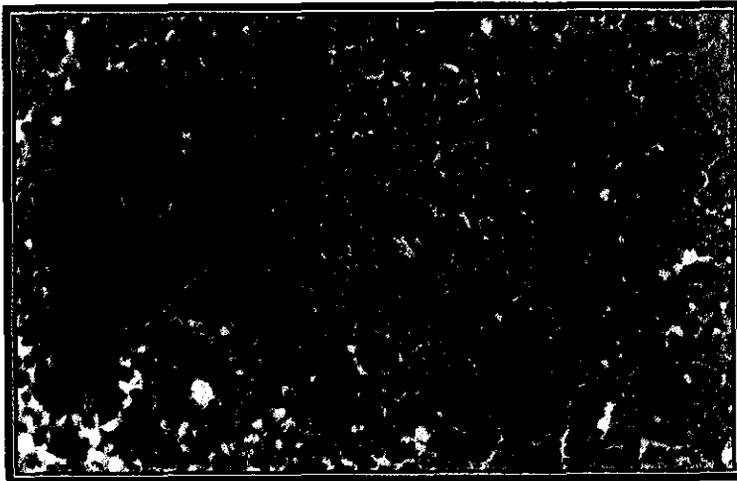
ÁREA PROMEDIO DE VAINAS PERIARTERIALES EN BAZO DE AMBOS GRUPOS DE ANIMALES



Gráfica 12. La gráfica presenta los resultados comparativos entre los grupos, de la evaluación de las áreas de las vainas periarteriales (VP). En el eje de las ordenadas se muestra el área de las VP en mm², y en el eje de las abscisas, los promedios de los dos grupos.



Fotografía 5. La evaluación histológica de los linfonodos mesentéricos mostró mayor cantidad de folículos linfoides primarios (FL1) en los tejidos del grupo de animales testigo, aunque en tamaño, tanto FL1 como folículos linfoides secundarios (FL2), los linfonodos de los animales del grupo tratado con el probiótico experimental presentaron comparativamente mayor área. Los FL1 se diferencian de los FL2 por la presencia de un centro germinativo (células linfoides con núcleos de cara abierta) y una corona de maduración (células linfoides con núcleos de cara cerrada) en estos últimos, ausentes en los FL1. Linfonodo mesentérico posterior. Lechón tratado. Tinción HE. X80.



Fotografía 6. De las estructuras esplénicas que participan en la respuesta inmune del animal, se encuentran las vainas periaortales (VP), formadas por linfocitos rodeando a la arteriola central o esplénica (A). El tamaño de las VP (comprendido entre las flechas), fue mayor en el grupo de animales tratado con el probiótico experimental. Bazo. Lechón tratado. Tinción HE. X320.

7. DISCUSIÓN

La cuantificación de los LIE en los segmentos intestinales, no mostró mayor presencia en los lechones a los que se les administró el probiótico experimental, excepto en los segmentos intestinales de duodeno, en donde la diferencia fue altamente significativa. Considerando los resultados obtenidos en investigaciones anteriores, ²³ la cantidad de LIE reportada fue de $13.8 \pm 2.6 \%$, mientras que en el presente trabajo, la cantidad fue ligeramente mayor con la administración del probiótico ($14.96 \pm 3.98 \%$). Este resultado es de gran importancia, ya que si se considera que el duodeno es el primer segmento intestinal que está expuesto a la estimulación antigénica, ésta primer línea de defensa se está capacitando para dar una mejor respuesta a futuras exposiciones.

Las células plasmáticas realizan una importante función en la protección inmediata y prolongada del organismo contra los antígenos. Estas células sintetizan y secretan grandes cantidades de anticuerpos que son parte de las respuestas

inmunológicas específicas. Estas células se pueden encontrar en el tejido conectivo, pero generalmente se localizan en las regiones que están sujetas continuamente a estímulos antigénicos y son parte de la población celular residente en la lámina propia del tracto gastrointestinal. ⁶ Al estudio histológico de la lámina propia del duodeno, con la coloración de rutina, la presencia de éstas células no demostró diferencias significativas, aunque a la revisión con la tinción especial de verde metil pironina se observó un decremento cuantitativo en éste segmento intestinal en los animales del grupo tratado. Para el estudio histológico, resulta más fácil identificar las células pironinófilas de tonalidad rojiza en un fondo verde-azul, en comparación con la tonalidad basófila que se observa en la coloración de rutina. Considerando al fenómeno de recirculación linfocitaria como un proceso activo, se puede pensar en una mayor inducción en la migración de tales células, favorecida por la administración del probiótico experimental en el grupo de animales tratado, hacia los linfonodos regionales, preparando inmunológicamente a esta primer región intestinal.

Las funciones precisas de los eosinófilos aún son poco claras. Como los neutrófilos, los eosinófilos pueden actuar como fagocitos efectores en estadíos finales, pero su gran longevidad y múltiples capacidades biológicas le otorgan el potencial para una diversidad mucho más grande. ⁴³ Es en el duodeno en donde histológicamente se encuentran las diferencias más relevantes en lo que se refiere a este tipo celular; las muestras de esta porción intestinal en los lechones tratados muestran una presencia menor de granulocitos eosinófilos, en comparación con los del grupo testigo, al evaluarse con la tinción de rutina. No obstante, al ser evaluados con la tinción especial para granulocitos eosinófilos, tal diferencia ya no fue significativa. No todas las células con gránulos eosinófilos observadas con la coloración de HE son granulocitos eosinófilos. Probablemente, esto debido a la mayor especificidad de la tinción.

En los cortes histológicos de yeyuno, resulta importante la mayor cantidad de células linfoides activadas, cuantificadas en la coloración específica (VMP), en los animales tratados. Considerando la longitud, comparativamente mayor, de este

segmento intestinal en los animales, la presencia de estas células provee de una amplia barrera inmune, mucho más capacitada para responder a los estímulos antigénicos. Aunque la evaluación de la cantidad de células plasmáticas con la coloración de rutina no presentó diferencia estadística, los segmentos intestinales de los lechones tratados presentaron mayor cantidad de células, lo que se traduce en una mayor especificidad de la tinción especial VMP en comparación con la HE, para estas células.

En las modificaciones de la mucosa intestinal de íleon, conocidas como domos, es donde se localizan las células especiales M, que son capaces de capturar y por transcitosis de las partículas de antígeno, dar inicio a la respuesta inmune. La mayor cantidad de estas modificaciones epiteliales en las muestras de íleon de los lechones tratados con el probiótico, determina la mayor presencia de éstas células 'presentadoras de antígenos' a otra de las barreras inmunes localizadas en la submucosa de íleon, que son las placas de Peyer. Es en estas estructuras donde se encuentran algunas células plasmáticas

productoras de IgA, aunque las placas de Peyer por sí mismas, son la fuente de precursores de células plasmáticas productoras de esta inmunoglobulina, que migran y subsecuentemente pueblan la lámina propia de este segmento intestinal. ⁶⁰

Comparativamente, los folículos linfoides de los linfonodos mesentéricos, resultaron modificados en los lechones con los que se trabajó. Los folículos linfoides primarios, observados en la ausencia de estimulación antigénica, se presentaron en mayor cantidad en los animales testigo, con un nivel de significancia alto y aunque para los folículos linfoides secundarios no hubo diferencia entre los dos grupos de animales, la superficie de estas estructuras presentó mayor área en los animales tratados, lo que significa que tienen una mejor respuesta inmune, pues los folículos secundarios se presentan cuando hay un estímulo antigénico y los linfoblastos están en división constante, originando un aumento en el tamaño de estas estructuras.

La mayoría de los linfocitos localizados en el tracto intestinal, migran a los linfonodos mesentéricos, donde proliferan y se diferencian. Después migran a las membranas mucosales (la mayoría al tracto digestivo), en donde producen IgA, que se combina con el componente secretorio en el epitelio, y por exocitosis, pasar al lumen intestinal. ⁶⁰

La presencia de células pironinófilas evaluadas con la tinción especial demuestran una mayor cantidad en los linfonodos de los lechones tratados, ubicadas entre los folículos linfoides medulares, lo que pone de manifiesto el fenómeno de migración vía linfática de los linfocitos activados probablemente por la influencia del probiótico en el tracto intestinal.

Cuando los antígenos viajan en sangre, quedan atrapados en parte en el parénquima esplénico, ahí son captados por los macrófagos que se ubican en la zona marginal y tapizan los sinusoides de la pulpa roja. Dichos macrófagos presentan los antígenos en los folículos primarios de la pulpa blanca, de los cuales, después de unos pocos días emigran las células

productoras de anticuerpos. Los linfoblastos en la periferia de la pulpa blanca son el primer indicador de respuestas inmunes de tipo humoral. ^{6,76}

Muchas de las variables evaluadas en los cortes histológicos del bazo resultaron estadísticamente significativas a favor de los lechones tratados. Los focos de células plasmáticas que se encontraron en el parénquima esplénico, observados con la tinción HE, en la pulpa blanca en particular, fue una de las variables que se evaluó en este trabajo. Los lechones a los que se les administró el probiótico mostraron mayor cantidad de estos cúmulos, lo que es indicativo de una mayor inducción de linfoblastos para la formación de células plasmáticas; incluso, al cuantificar las células por campo observado con el objetivo seco fuerte (X320) con la tinción HE, el grupo tratado presentó mayor cantidad, y aunque en menor número, pero con una diferencia estadística mayor, las células pironinófilas observadas con la coloración especial, fue mayor en el mismo grupo tratado. Esto debido a la mayor especificidad de la coloración hacia las células plasmáticas.

La cantidad de vainas periarteriales observadas con la tinción de HE en el parénquima, no mostró diferencia estadística entre los grupos. Sin embargo, el tamaño de estas estructuras fue altamente significativo, mientras los lechones testigos presentaron en promedio, áreas con poco desarrollo, los lechones tratados tuvieron áreas comparativamente mayores. Si se considera que la vaina periarterial está formada en su mayoría por linfocitos T, adyacentes a la túnica media de la arteria nodular, y por linfocitos B en la región periférica a la zona T, ⁶ se puede deducir una mayor cantidad de éstas células en el parénquima esplénico, preparando al animal para una mejor respuesta inmune, tanto humoral como celular.

En la interpretación de las variables evaluadas, se debe considerar la importante influencia que tiene el calostro en la transferencia de la inmunidad en los lechones, dado el tipo de placentación en esta especie animal, la totalidad de la transferencia de las inmunoglobulinas y células linfoides (inmunidad pasiva) se realiza a través de las primeras secreciones de la glándula mamaria.

Numerosos trabajos han puesto de manifiesto los resultados prácticos del uso de probióticos, la mayoría de ellos enfocados al mejoramiento de los parámetros productivos, ganancia diaria de peso, peso al destete, entre otros. Otros muchos se enfocan a los efectos que los probióticos tienen en el tratamiento de algunas condiciones patológicas, como infecciones intestinales, intolerancia a la lactosa, mejoramiento de las funciones intestinales, actividad antitumoral y efectos anticolesterolémicos, pero son escasos los trabajos que evalúan, mediante la histología, que cambios se inducen en los órganos linfoides para mejorar la respuesta inmune de los efectos antes descritos.

La utilización de las coloraciones especiales para observar células linfoides activadas y granulocitos eosinófilos resultaron herramientas auxiliares para la evaluación de los tejidos linfoides, debido a que algunas de las variables que se consideraron, no mostraron significancia al ser evaluadas con la coloración de rutina, pero si lo fueron al ser evaluadas con la coloración específica.

8. CONCLUSIONES

Retomando los objetivos establecidos al inicio del trabajo, la realización de este estudio histológico apoya más el uso de los probióticos en esta especie animal en particular.

El estudio histológico de las muestras de tejido linfoide, mostró que las variables modificadas en los grupos experimentales posiblemente determinan un mejor estado inmune en aquellos a los que se dio el probiótico, considerando:

- La cantidad de linfocitos intraepiteliales se vio aumentada en la mucosa de las muestras de duodeno de los animales del grupo tratado, pero no en el resto del intestino.

- Tanto la cantidad de células pironinófilas observadas con la coloración especial de VMP, como la cantidad de granulocitos eosinófilos observados con la coloración de rutina en la lámina propia de los duodenos de los animales tratados, fue menor en comparación con los tejidos de los animales del grupo tratado.

- La cantidad de células pironinófilas en la lámina propia de las muestras de yeyuno de los animales tratados, fue mayor en comparación a lo encontrado en las muestras del grupo testigo.

- La cantidad total de domos en la mucosa de íleon fue mayor en las muestras de los animales del grupo tratado.

- El área de los folículos linfoides presentes en los cortes de linfonodo mesentérico posterior, determinada en mm², fue mayor en las muestras del grupo tratado.

- La cantidad de células pironinófilas encontradas en la zona medular de los cortes de linfonodo mesentérico fue mayor en los animales tratados.

- El número de células plasmáticas observadas en el parénquima esplénico con las coloraciones de HE y VMP, resultó mayor en los animales del grupo tratado.

- El área de las vainas periarteriales, determinada en mm^2 , fue mayor en los cortes de bazo de los animales tratados con el probiótico experimental.

APÉNDICE

I. MATERIAL UTILIZADO EN EL TRABAJO.

Cubos de parafina con:

- a) Tejidos del grupo testigo.
- b) Tejidos del grupo tratado.

Microtomo.

Portaobjetos y cubreobjetos.

Tren de tinción para la técnica histológica Hematoxilina y Eosina:

- Xileno.
- Alcohol etílico absoluto.
- Alcohol etílico 96°.
- Hematoxilina de Harris.
- Eosina amarillenta en solución alcohólica.
- Resina sintética.
- Ácido clorhídrico.
- Ácido acético.

Tren de tinción para la técnica histológica Verde Metil Pironina:

- Solución de Pironina Y.
- Verde de metilo.
- Solución buffer de ftalatos.
- 2-butanol.

Tren de tinción para la técnica histológica específica de granulocitos eosinófilos:

- Cromótopo 2R.
- Fenol.

Para la observación y evaluación:

- Microscopio óptico (Carl Zeiss).
- Ocular con escala graduada para la evaluación de estructuras histológicas.
- Contador leucocitario convencional.
- Programa estadístico Execustat versión 3.0.

PARA DESPARAFINIZAR E HIDRATAR ^{5,74}

1. Se colocaron los portaobjetos con los cortes histológicos en tres cambios sucesivos de xilol, durante 10 minutos cada uno.
2. Posteriormente se hicieron pasar en alcohol de 100°, 96°, 80°, 70° y 50° por 3 minutos en cada uno.
3. Se colocaron en agua destilada para después ser teñidos con cada una de las tres tinciones empleadas en este estudio.

II. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES COLORANTES. 5.74

HEMATOXILINA DE HARRIS. Los dos colorantes más utilizados para teñir cortes histológicos son la hematoxilina y la eosina. La hematoxilina se obtiene del llamado palo de Campeche o *Hematoxylum campechanum*, de color rojo parduzco. En la tinción HE, se utiliza un colorante débil llamado hemateína, en combinación con iones de aluminio, y el complejo formado, que es la hematoxilina alumínica, posee un color violeta profundo. El segundo colorante es la eosina, da una coloración que va del rosa al rojo a casi todos los componentes tisulares que no son teñidos por el color violáceo de la hematoxilina. Los radicales cromógenos de la hematoxilina y la eosina se ligan con componentes tisulares de carga contraria. De este modo, el complejo de hemateína y aluminio en la hematoxilina se liga a los sitios de la carga negativa, en los componentes basófilos; y el anión cromógeno de la eosina se liga a sitios con carga positiva en componentes acidófilos, sin embargo, no hay ninguna especificidad respecto a dicha unión. 18,74

Para la preparación de la Hematoxilina de Harris se requirieron los siguientes reactivos:

- | | |
|--|---------|
| ▪ Hematoxilina (Merck) | 1.0 gr. |
| ▪ Óxido rojo de mercurio | 0.5 gr. |
| ▪ Sulfato de aluminio y amonio o potasio (alumbre) | 20 gr. |
| ▪ Alcohol etílico absoluto | 10 ml. |
| ▪ Agua destilada | 200 ml. |

Se procedió de la siguiente forma:

1. Se disolvió la Hematoxilina en el alcohol absoluto, calentando a baño maría y tapando.
2. En otro recipiente se disuelve el alumbre en 100 ml de agua destilada.
3. Se mezclaron las dos soluciones y se añadió a los 100 ml del agua restante.
4. Se hizo hervir la mezcla lo más rápido posible, y se agregó cuidadosamente el óxido rojo de mercurio hasta que tomó un color rojo púrpura.
5. Enseguida se enfrió con hielo a baño maría y se filtró 10 veces.
6. Se le agregaron de 3 a 5 gotas de ácido acético por cada 10 ml de solución.

EOSINA ALCOHÓLICA. Para la preparación de la Eosina se requirieron de los siguientes reactivos:

- | | |
|------------------|--------|
| ▪ Eosina azulosa | 1.0 gr |
| ▪ Orange G | 1.0 gr |
| ▪ Alcohol de 70° | 100 ml |

En la preparación de la Eosina alcohólica, bastó con mezclar todos los reactivos en frío y filtrar cada vez que se usó.

Para esta tinción, después de que los cortes estuvieron en agua destilada, los procedimientos fueron los siguientes:

1. Se colocó en la Hematoxilina de Harris durante 10 a 15 segundos.
2. El exceso de colorante se eliminó con agua corriente.
3. Se lavó con agua destilada.
4. Posteriormente, los cortes se colocaron en la Eosina alcohólica durante 2 a 3 minutos.
5. Se deshidrataron los cortes con alcoholes de 96° (dos cambios) y absoluto, durante 5 minutos en cada uno.
6. Para aclarar los cortes ya teñidos, se colocaron en xilol durante 5 minutos y después, se cubrieron con resina para colocar sobre ellos el cubreobjetos.

Resultados de la tinción. Con esta tinción, los núcleos de las células se observan de color azul morado y el citoplasma y las sustancias intracelulares de naranja a rojo.

VERDE METIL PIRONINA. El método de elección para demostrar RNA es por la técnica de Verde Metil Pironina (VMP). En esta técnica, la pironina, bajo condiciones controladas, es específica para RNA, aunque la reacción química no está bien definida. La pironina colorea además, algunas células mucosas ^{18,74}.

Para la preparación de la solución teñidora, se requirieron las siguientes soluciones:

A. 0.01 M ftalato buffer, pH 4.0.

- Ftalato de potasio hidrogenado
(KHC₈H₈O₄): 1.02 gr
- Agua 490 ml
- Ácido clorhídrico (HCl) al 0.01 M 1 ml

B. Mezcla en seco.

- Pironina Y 0.03 gr
- Verde de metilo 0.15 gr
- Buffer (solución A) 100 ml

Para la preparación de la solución teñidora, se realizó lo siguiente:

1. Se preparó la solución buffer A mezclando el ftalato, el agua y el ácido clorhídrico.
2. Se revisó el pH, el cual debía estar entre 4.0 y 4.6, siendo el óptimo 4.0.
3. Se añadió agua hasta tener un volumen de 500 ml de la solución A.

4. Se mezclaron la Pironina Y y el Verde de Metilo por separado, para después adicionarse a 100 ml de la solución A.

Para esta tinción, después de que los cortes están en agua destilada, los procedimientos fueron los siguientes:

1. Se dejaron 10 minutos en el colorante verde de metilo-pironina.
2. Se enjuagaron los cortes en agua destilada por 5 segundos (dos cambios), sacudiendo lo más que se pudo el agua restante.
3. Se deshidrató agitando vigorosamente en 2-butanol (tres cambios), durante dos minutos cada uno. Es este paso el que da la tonalidad verde claro a los cortes.
4. Se aclaró en xilol durante 5 minutos y se cubrieron con la resina y el cubreobjetos.

Resultados de la tinción. Con esta tinción, el DNA (núcleos) se tiñe de color azul-verde por el verde de metilo, y el RNA de color rojo (nucleolos, citoplasma de células plasmáticas), por la pironina Y.

CARBOL CROMÓTROPO. En esta tinción que es especial para observar los granulocitos eosinófilos se requirió de los siguientes reactivos:

- Fenol 1 gr
- Cromótropro 2R 0.5 gr
- Agua destilada 100 ml

Para preparar la solución teñidora fue necesario realizar lo siguiente:

1. Se derritió el fenol en un frasco a baño maría.
2. Se añadió el cromótropro 2R.
3. Se mezcló y disolvió el sedimento resultante en el agua destilada, para después filtrar la solución.

Luego de que los cortes histológicos están en el agua destilada se procedió como sigue:

1. Se coloreó el corte con la Hematoxilina de Harris durante 10 a 15 segundos, para diferenciar los núcleos de las células, de los gránulos.
2. El exceso de colorante se eliminó con agua corriente.
3. Posteriormente se coloreó con la solución carbol cromótropro 2R durante 30 minutos.
4. El exceso de colorante se eliminó con agua corriente.
5. Se deshidrató haciendo pasar los cortes por alcohol en concentraciones crecientes de 70°, 80°, 90°, 96° y absoluto.

6. Para aclarar las muestras se mantuvieron en xilol durante 2 a 3 minutos y se cubrieron con la resina y el cubreobjeto.

Resultados de la tinción. En esta tinción, la Hematoxilina de Harris tiñe los núcleos de tonalidad azul-morado, y el Cromótopo 2R, hace resaltar los gránulos de los eosinófilos con una coloración roja.

LITERATURA CITADA

1. Abin J G. Studies of the capability of the young pig to secrete gastric acid after weaning. PhD. Thesis, University of Minnesota. 1985.
2. Alderete J F, Robertson D C. Nutrition and enterotoxin synthesis by enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*; defined medium for production of heat-stable enterotoxin. *Infect Immun.* 1977; 15: 781-788.
3. Allen W D, Porter P. The relative frequencies and distribution of immunoglobulin-bearing cell in the intestinal mucosa of neonatal and weaned pigs and their significance in the development of secretory immunity. *Immunology.* 1977; 32: 819-824.
4. Argenzio R A Comparative physiology of the gastrointestinal system. In *Veterinary Gastroenterology.* Ed N. V. Anderson. Philadelphia. Lea & Fabiger. 1980; 172-198.
5. Bancroft J D, Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 3rd. edition. Churchill Livingstone Inc. USA. 1990; 107-118.
6. Banks W J. *Histología Veterinaria Aplicada.* Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V. 1ª reimpr. México, D.F. 1990.
7. Barnes E. Anaerobic bacteria of the normal intestinal microflora of animals. In: Barnes, E.M. and Mead, G.C. (eds). *Anaerobic Bacteria in Habitats Other than Man.* Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1986; 225-238.
8. Barrow P A, Brooker B E, Fuller R, Newport M J. The attachment of bacteria to the gastric epithelium of the pig and its importance in the microecology of the intestine. *Journal of Applied Bacteriology.* 1980; 48, 147-154.
9. Bealmear P M, Holtermann O A, Mirand E A. Influence of the microflora on the immune response, I.: General characteristics of the germ-free animal. In *The Germ-free Animal in Biomedical Research* ed. Coates M E, Gustafsson B E. London: Laboratory Animals Ltd. 1984; 335-346.
10. Berg R D. Translocation of indigenous bacteria from the intestinal tract. In *Human Intestinal Microflora in Health and Disease.* Ed. Hentges D J. London Academic Press. 1983; 333-352.
11. Bianchi A T J, Zwart R J, Jeurissen S H M, Moonen-Leusen H W M. Development of the B- and T-cell compartments in porcine lymphoid organs from birth to adult life; an immunohistological approach. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 1992; 33: 201-221.
12. Bienenstock J, Befus A D. Mucosal immunology. *Immunology.* 1980; 41: 249-270.
13. Binns R M. Cellular immunology in the pig. *Proc. Royal Soc. Med.* 1973; 66: 1155.
14. Binns R M. Organization of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 1982; 3: 95-146.

15. Blecha F, Charley B. Rationale for using immunopotentiators in domestic food animals. In *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. Academic Press, Inc. 1990; 35: 3-19.
16. Bloksma N, Ettekoven H, Hothuis F M, Van Noorle-Jansen L, De Reuver M J, Kreelenberg J G, Willers J M. Effects of lactobacilli on parameters of non-specific resistance of mice. *Medical Microbiology & Immunology*. 1981. 170: 45-53.
17. Conway P L, Gorbach S L, Goldin B R. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science*. 1987; 70: 1-12.
18. Cormack D H. *Histología de HAM*. 9ª edición. Harper & Row Publishers. Harla, S.A. de C.V. México, D.F. 1988; 18-21.
19. Cruz C, Sahagún R. Consideraciones acerca de la fisiología digestiva del lechón y resultados con el uso de probióticos en México. En: *Biotechnología en la Industria de Alimentación Animal*, Colección de Apligén, S. A. de C. V. Editado por SETIC, S.A. de C.V. México, D.F. Febrero 1994; IV: 75-98.
20. Cubillos V, Canal A M. *Patologías digestivas en cerdos lactantes y adultos*. Memorias V Pre-Congreso de Patología Veterinaria. Qro., México. 1996.
21. Chu R M, Liu C H. Morphological and functional comparisons of Peyer's patches in different parts of the swine small intestine. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 1984; 6: 391.
22. Chu R M, Glock R D, Ross R F. Gut-associated lymphoid tissues of young swine with emphasis on dome epithelium of aggregated lymph nodules (Peyer's patches) of the small intestine. *Am. J. Vet. Res*. 1979; 40(12): 1720.
23. Chu R M, Glock R D, Ross R F, Cox D F. Lymphoid tissues of the small intestine of swine from birth to one month of age. *Am. J. Vet. Res*. 1979; 40 (12) 1713-1719.
24. Drasar B S, Barrow P A. *Intestinal Microbiology*. Van Nostrand Reinhold, Wokingham, UK. 1985.
25. Ducluzeau R, Bellier M, Raibaud P. Transit digestif de divers inoculums bacteriens introduits 'per os' chez des souris axéniques et holoaxéniques (conventionnelles): effect antagoniste de la microflor du tractus gastro-intestinal. *Zbl. Bakt. I. Orig*. 1970; 213: 533-548.
26. Fahmy M, Besnard C. Causes of mortality in Yorkshire pigs from birth to 20 weeks of ages. *Canad. J. Anim. Sci*. 1971; 5 (2): 351-359.
27. Field L H, Underwood J L, Pope L M, Berry L J. Intestinal colonization of neonatal animals by *Campylobacter foetus* subsp. *jejuni* *Infect. Immun*. 1981; 33: 884-892.
28. Freter R. Factors affecting the microecology of the gut. In: *Probiotics: The Scientific Basis* (R. Fuller, ed.). Chapman and Hall, London, UK. 1992; 111-144.
29. Fuller R. Ecological studies on the lactobacillus flora associated with the crop epithelium of the fowl. *Journal of Applied Bacteriology*. 1973; 36, 131-139.
30. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol*. 1989; 45: 389-395.
31. Gedek von B R. Intestinal flora and boiseifugulation. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*. 1989; 8: 417-437.

32. Goldin B R, Gorbach S L. The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1984; 39, 756-761.
33. Golub E S. *Base Celular de la Respuesta Inmunológica*. 2ª edición. Ed. Reverté, S.A. España. 1987.
34. González-Vega D, Cisneros M I, Vega L M A, Morilla G A. Perfil inmunológico de los cerdos durante las primeras diez semanas de edad. *Vet. Mex.* 1993; 24 (3): 217.
35. Hentges D J. Enteric pathogen - normal flora interactions. *Am. J. Clin. Nutr.* 1970; 23: 1451-1456.
36. Hentges D J. Gut flora in disease resistance. In: *Probiotics, The Scientific Basis* (R. Fuller, ed.). Chapman and Hall, London, UK. 1992; 87-110.
37. Horak V, Hurban V, Dvorak P. The tissue distribution of IgA and IgM positive cells in adult and newborn miniature pigs. *Anat. Histol. Embryol.* 1989; 157.
38. Husband A J, Watson D L. Immunity in the intestine. *Vet. Bull.* 1978; 48: 911-924.
39. Janeway C. Frontiers of the immune system. *Nature*, 1988; 333: 804-806.
40. Janeway C, Jones B, Hayday A. Specificity and function of T cells bearing $\gamma\delta$ receptors. *Immunol. Today*, 1988; 9: 73-76.
41. Johnson L R. ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*, 2nd. ed. New York; Raven Press. 1987.
42. Johnson M, Fitzgerald G, Welter M, Welter C. The six most common pathogens responsible for diarrhea in newborn pigs. *Vet. Medicine*. April 1992; 382-386.
43. Jones D G. The Eosinophil. *J. Comp. Path.* 1993; 108: 317-335.
44. Jonjic N, Jonjic S, Saaimuller A, Rukavina D, Koszinowski U H. Distribution of T-lymphocyte subsets in porcine lymphoid tissues. *Immunology*. 1987; 60: 395.
45. Juven B J, Meinersmann R J, Stern N J. A review. Antagonistic effects of *Lactobacilli* and *Pediococci* to control intestinal colonization by human enteropathogens in live poultry. *J. Appl. Bacteriol.* 1991; 70: 95-103.
46. Kolornytsev A A. Development of the immune system in SPF pigs. *Veterinarya Moscow, USSR*. 1984; 3:36.
47. Kraehenbuhl J P, Neutra M R. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiological Reviews*. 1992; 72: 853-879.
48. Lee A. Neglected niches - the microbial ecology of the gastrointestinal tract. In: Marshall, K. C. (ed). *Advances in Microbial Ecology*, Vol. 8. Plenum Press, New York. 1985; 115-162.
49. Lee B. *Lo Esencial de la Inmunología*. 2ª edición. Ed. Manual Moderno, S.A. México, D.F. 1987.
50. Lyons T P. La aplicación de productos microbianos naturales en la producción porcina. En *Biotechnología en la Industria de Alimentación Animal*, vol II. Colección de Apligén. Editado por SETIC, S.A. de C.V. México, D.F. Marzo 1991; 47-75.
51. Lloyd A B, Cumming R B, Kent R D. Prevention of *Salmonella typhimurium* infection in poultry by pretreatment of chickens and poults with intestinal extracts. *Aust. Vet. J.* 1977; 53: 82-87.

52. Maxwell F, Stewart C S. Isolation and characteristics of bifidobacteria from pig faeces. In: Les Bacteries Lactiques. Adria Normandie, Caen. 1991.
53. McCauley I, Hartmann P E. Changes in piglet leukocytes, B lymphocytes and plasma cortisol from birth to three weeks after weaning. Res. Vet. Sci. 1984; 37: 234.
54. McCauley I, Hartmann P E. Changes in the proportion and absolute number of T lymphocytes in piglets from birth until after weaning and in adults. Res. Vet. Sci. 1984; 37:52.
55. McFarlin D E, Binns R M. Lymph node function and lymphocyte circulation in the pig. In: Jankovic, B.D. and Isakovic, K. (eds). Microenvironmental Aspects of Immunity. Plenum Press, New York. 1973.
56. McNabb P C, Tomasi T B. Host defense at mucosal surfaces. A. Rev. Microbiol. 1981; 35: 477-496.
57. Moberg L J, Sugiyama H. Microbial ecological basis of infant botulism as studied with germfree mice. Infect. Immun. 1979; 25: 653-657.
58. Muralidhara K S, Sheggeby G G, Elliker P R, England D C, Sandine W E. Effect of feeding lactobacilli on the coliform and lactobacillus flora of intestinal tissue and feces from piglets. J. Food Prot. 1977; 40: 288-295.
59. Newby T J, Stokes C R. The intestinal immune system and oral vaccination. Vet. Immunol. Immunopathol. 1984; 6: 67-94.
60. Nicander L, Brown E M, Delman H D, Landsverk T. Lymphatic organs. In: Textbook of Veterinary Histology. 4th ed. H.- Dieter Dellman editor. 1990; 120-135.
61. Nieuwenhuis P, Ford W L. Comparative migration of B- and T-lymphocytes in the rat spleen and lymph nodes. Cellular Immunology. 1976; 23: 254-267.
62. Nurmi E, Rantala M. New aspects of Salmonella infection in broiler production. Nature. 1973; 241: 210-211.
63. Pabst R, Geisler R. The route of migration of lymphocytes from blood to spleen and mesenteric lymph nodes in the pig. Cell and Tissue Research. 1981; 221: 361-370.
64. Pabst R, Geist M, Rothkötter H J, Fritz F J. Postnatal development and lymphocyte production of jejunal and ileal Peyer's patches in normal and gnotobiotic pigs. Immunology. 1988; 64: 539-544.
65. Perdigón G, De Macías M E N, Álvarez S, Oliver G, De Ruíz Holgado A A P. Effect of perorally administrated lactobacilli on macrophage activation in mice. Infection and Immunity. 1986; 53, 404-410.
66. Pivnick H, Nurmi E. The Nurmi concept and its role in the control of *Salmonellae* in poultry. In Developments in Food Microbiology - 1 (R. Davies, ed.). Applied Science Publishers, Essex, UK. 1982; 1-70.
67. Rojas A. Estudio preliminar de la mortalidad neonatal en cerdos (nacimiento-7 días) Inf. Pract. Universidad de Chile. 1990.
68. Rolfe R D, Helebian S, Finegold S M. Bacterial interference between *Clostridium difficile* and normal fecal flora. J. Infect. Dis. 1981; 143: 470-475.

69. Rothkötter H J, Ulrich H, Pabst R. The postnatal development of gut lamina propria lymphocytes: number, proliferation and T and B cell subsets in conventional and germ-free pigs. *Pediatric Reserch.* 1991; 29: 237-242.
70. Saito H, Tomioka H, Sato K. Enhanced resistance of *Lactobacillus* against *Listeria* infection in mice. *Medicine and Biology.* 1981; 102, 273-277.
71. Sanderson C J. Interleukin-5, eosinophils and disease. *Blood* 1992; 79: 3101-3109.
72. Savage D C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Reviews of Microbiology.* 1997; 31: 107-133.
73. Savage D C. Factors influencing biocontrol of bacterial pathogens in the intestine. *Food Technol.* 1987; 41: 82-87.
74. Stevens A. The Hematoxylin. In *Theory and Practice of Histological Techniques.* 3rd. edition. Churchill Livingstone Inc. USA. 1990; 107-118.
75. Stokes C R, Vega-López M A, Bailey M, Telemo E, Miller B G. Immune development in the gastrointestinal tract of the pig. In: Varley, M.A., Williams, P.E.V. and Lawrence, T.J.L. (eds). *Neonatal Survival and Growth.* Occasional Publication No. 15. British Society of Animal Production, Reading. 1992.
76. Tizard I. *Inmunología Veterinaria.* Ed. Interamericana-McGraw-Hill. 3ª ed. México, D.F. 1989.
77. Tubbs R, Hurd H, Dargatz D, Hill G. Prewaning morbidity and mortality in the United States swine herd. *Swine Health and Production.* 1993; 1 (1) 21-28.
78. Van Der Waaij D, Berghuis-de Vries J M, Lekkerkerk-Van der Wees J E C. Colonizations resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J. Hyg.* 1971; 59: 405-411.
79. Vega-López M A. Immune development in the young pig. Tesis de Doctorado (PhD). University of Bristol, Reino Unido. 1991.
80. Vilpo J A, Harkönen M J, Teir H. Distribution of tissue eosinophil granulocytes in cow and pig organs. *Scand. J. Haematol.* 1970; 7: 219-221.